



# THÈSE

## En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Cotutelle internationale : Université Saint-Joseph

---

Présentée et soutenue par

**Souraya SAYEGH**

Le 17 décembre 2019

**Les cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu  
adipeux dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde :  
Approches in vitro et in vivo**

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **IMMUNOLOGIE**

Unité de recherche :

**CPTP - Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan**

Thèse dirigée par

**Jean-luc DAVIGNON et Viviane TRAK-SMAYRA**

Jury

**M. Alain CANTAGREL**, Président du Jury

**Mme Florence APPARAILLY**, Rapporteur

**M. Fadi ABDEL-SATER**, Rapporteur

**M. Jean-Thomas VILQUIN**, Examineur

**M. Nassim FARES**, Examineur

**M. Jean-luc DAVIGNON**, Directeur de thèse

**Mme Nada Alaaeddine**, Directrice de thèse (jusqu'au 31 Décembre 2017)

**Mme Viviane TRAK-SMAYRA**, Directrice de thèse (à partir du 01 Janvier 2018)



# Remerciements

Je tiens à remercier d'abord le Professeur **Alain Cantagrel** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et de ses commentaires constructifs tout au long de mon parcours doctoral. Je tiens à remercier également les Professeurs **Florence Apparilly** et **Fadi Abdel-Sater**, en tant que rapporteurs, le Professeur **Nassim Fares** et le Docteur **Jean-Thomas Vilquin**, en tant qu'examineurs, d'avoir accepté de juger mon travail. Merci pour le temps que vous avez consacré à la lecture de mon manuscrit ainsi que pour les commentaires et discussions très enrichissantes que j'ai eues le privilège d'avoir avec vous.

Je remercie mon directeur de thèse, le Docteur **Jean-Luc Davignon**, de m'avoir accueillie au sein de son équipe en m'ouvrant ainsi la voie vers le métier qui me tient le plus à cœur. Je te remercie de m'avoir introduit au monde de la recherche en rhumatologie et de m'avoir appris l'expérimentation animale malgré ma réticence initiale à le faire, de la confiance et l'autonomie que tu m'as accordées et de ton soutien au cours de ces années.

Merci à ma directrice de thèse, le Docteur **Viviane Trak-Smayra**, pour son encouragement et soutien administratif, surtout vers la fin. Je vous remercie pour votre implication dans l'aboutissement de la thèse et votre venue de Beyrouth à Toulouse pour ma soutenance. Je remercie également mon ancienne directrice de thèse, le Docteur **Nada Alaaeddine**, pour son soutien et ses conseils.

Un grand merci aux membres de mon comité de suivi de thèse les Docteurs **Valérie Planat-Bénard**, **Mireille Sebbag** et **Sylvie Guerder** ainsi qu'à mon Parrain de thèse, toujours à mon écoute, le Docteur **Daniel Dunia**, pour leurs conseils et orientation qui ont permis l'amélioration continue de mes travaux.

A toute l'**équipe JPS**, je vous le redis, avec chaque obstacle rencontré, vous m'avez appris à voir le côté humoristique des choses. Je n'oublierai pas votre mobilisation en ma faveur lors des grands défis, votre soutien inconditionnel et votre curiosité pour la gastronomie libanaise.

A **Yannick, Benjamin, Katy, Michel et Jean-Fred**, ce travail n'aurait pu être mené à bien sans vos conseils, encouragements et l'esprit coopératif présent à chaque fois que je venais vers vous désespérée avec la fameuse question « est-ce que tu as 2 minutes ? ». Les nombreuses discussions fructueuses (et inévitablement, non-fructueuses) que nous avons eues ont été un élément clé pour ma réussite.

A **Sanaa et Séverine**, pour votre oreille attentive et pour avoir été à mon secours en mode « superwomen », avec **Cécile et Yannick**, lors de mes déménagements interminables. A **Emmanuelle**, pour son amour pour les gâteaux libanais qui imposaient mon visa de passage à chaque rentrée du Liban. Je vous remercie avec **Isabelle, Fabienne et Nicolas** pour les conversations qui allégeaient les longues heures d'analyse et de rédaction au bureau, toujours aussi diverses qu'enrichissantes (culture, voyages, jardinage, photos, protocoles expérimentaux, etc..).

Au grand trio inséparable de doctorants de 3<sup>e</sup> année **Katy, Ranime et Candide**, je vais l'admettre pour une fois : vous avez rajouté vos « positive vibes » à ma thèse. Les longues soirées au labo, les discussions philosophiques sur la vie, le fast food libanais, le « searching » en anglais garderont leur marque. Bon courage pour cette dernière ligne droite (et trouvez un moyen de soutenir tous la même semaine pour que je puisse me rendre à Toulouse).

Un grand merci aux Professeurs **Jean-Pierre Salles, Rémy Poupot, Hugues Chap, Jérôme Ausseil** ainsi qu'à **Zoubida Karim, Stéphanie Trudel, Juliette, Saber et Thibault** pour leurs commentaires constructifs lors des réunions et leur encouragement durant la période de pré-soutenance.

Mes remerciements vont au directeur du laboratoire le Professeur **Roland Liblau** et à tous les membres du CTP pour leur accueil au sein du centre, ainsi qu'au personnel des **plateformes de cytométrie et de zootechnie de Purpan** pour leur support et leur patience à nous apprendre les plus petits détails qui font une excellente manip.



Je tiens à remercier le **Centre de Rhumatologie** du CHU et les médecins qui ont participé à mon obtention de liquide articulaire de patients ou qui ont contribué à mon projet de point de vue clinique, notamment les Docteurs **Alain Cantagrel, Arnaud Constantin, Jean-Frédéric Boyer, Yannick Degobé** et **Etienne Cavaignac**. Je remercie également les Docteurs **Valérie Planat-Bénard** et **Danièle Noël** pour m'avoir fourni des cellules souches mésenchymateuses pour des expériences complémentaires.

A tous les membres de mon ancien laboratoire de Médecine Régénérative et Inflammation à Beyrouth **Oula, Mayssam, Rim, Charbel** et **Robert**, je vous remercie pour votre aide et soutien à distance. Merci aux membres du laboratoire de Cancer et Métabolisme, le Docteur **Georges Hilal, Joëlle, Nadine**, (les) **Rita, Sara** et **Roula** pour leur soutien.

**Oula**, ta persévérance et ton dévouement à aider/inspirer tout le monde autour de toi sont un modèle à suivre dans le monde de la recherche. Je suis profondément reconnaissante de t'avoir eue à mes côtés au cours de cette aventure.

Aux nombreuses personnes qui ont animé mon séjour à Toulouse; **Ranime**, les deux **Fatima, Rana, Lyssa, Arthur, Zahra** et les autres (beaucoup trop nombreuses pour les citer toutes), un grand merci pour la sororité/fraternité, les courses au cinéma, le sushi et les fous rires qui ont fait qu'on ne se sentait jamais vraiment seuls ou loin de nos familles. Vous avez été un « home away from home ».

Cela est aussi vrai pour mes amies d'enfance et du Liban, **Sukayna, Nathaline, Oula, Marwa, Sabine, Ghina** et **Cynthia**. Votre soutien inconditionnel écartait toutes les distances et les longs Kms entre nous.

Mes remerciements les plus profonds vont à ma **famille** adorée. Je ne pourrai jamais retrouver les mots pour exprimer ma gratitude envers les nombreuses fois que vous m'aviez soulevée, réconfortée, obligée de faire sortir le meilleur de moi-même sans jamais lâcher.

Ma reconnaissance à mes **parents** est sans fin pour leurs énormes sacrifices, pour avoir développé en moi mon amour pour la science avec ce fameux proverbe qui résonne toujours à

mes oreilles « A force de forger, on devient forgeron », mais aussi pour leur soutien illimité à chaque fois que je venais vers eux avec une nouvelle décision aventureuse, tout en essayant en vain de cacher leur inquiétude.

A mes sœurs, mon frère, mon beau-frère, **Batoul, Farah, Youssef et Ali**, vous êtes « my safety net » et vous le serez toujours. Grâce à vous, je suis un peu plus courageuse à prendre les petits risques parce que je sais très bien qu'en cas d'échec, vous serez là à me dire « la takrahu shay2, habibteh sou, basita habboul, shu beha ekhtik ?! ».

A ma nièce et mon neveu, **Fatima et Hassan**, sachez que vous étiez ma vraie source d'inspiration tout au long de ce parcours. J'espère vous inspirer à mon tour à voir qu'avec un peu d'ambition et beaucoup de détermination, du courage et du travail sérieux, aucun obstacle n'est insurmontable pour réaliser vos rêves.

Finalement, une dernière pensée à mes grands-parents et surtout ma **grand-mère**, la grande combattante toujours optimiste avec son sourire hypnotisant, qui nous a récemment quittés. Sa lumière guidera toujours mon chemin. Loin des yeux, près du cœur.

*Aux personnes qui se reconnaîtront, celles qui m'ont tracé le chemin vers les étoiles, je vous dédie ce travail.*

“I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale.”

Marie Skłodowska-Curie

# Résumé

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune inflammatoire caractérisée par une synovite chronique aboutissant à la dégradation du cartilage et une érosion osseuse. Malgré la présence de stratégies thérapeutiques capables de contrôler la maladie, il n'existe aujourd'hui aucun traitement curatif. De nombreuses études ont déjà démontré les capacités immunomodulatrices des cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (ADSC) *in vitro* et dans des modèles murins de PR. Cependant, cet effet n'a toujours pas été traduit efficacement dans un contexte clinique. L'objectif de cette étude est de définir comment l'inflammation pourrait dicter l'efficacité thérapeutique des ADSC par (i) une approche translationnelle en utilisant des liquides synoviaux (SF) de patients atteints de PR ou (ii) en étudiant l'effet des injections d'ADSC dans deux modèles différents d'arthrite expérimentale. Nous montrons que les SF pro-inflammatoires conservent la capacité des ADSC à proliférer ainsi que leur phénotype et induisent l'expression des gènes COX-2, IDO, IL-6, TSG6, ICAM-1, VCAM-1 and PD-L1 qui sont tous impliqués dans le potentiel immunomodulateur des ADSC. Nous démontrons que l'effet des SF est directement médié par la voie de signalisation TNF/NF- $\kappa$ B et partiellement par l'IL-6. De plus, le pré-traitement des ADSC avec les SF inflammatoires renforce leur capacité à moduler les marqueurs pro-inflammatoires des macrophages (CD40 et CD80) et à induire des lymphocytes T régulateurs (Tregs). *In vivo*, les ADSC injectées par voie intra-péritonéale ont aggravé la progression d'arthrite dans le modèle de transfert de sérum K/BxN en traitement préventif mais n'ont eu aucun effet sur les scores arthritiques en traitement thérapeutique. En outre, un effet protectif sur la progression de l'arthrite n'a été observé que lorsque les ADSC ont été injectées par voie intra-articulaire. L'ensemble de nos résultats mettent en avant l'influence de l'environnement inflammatoire local sur les effets thérapeutiques des ADSC et suggèrent leur adressage direct aux sites inflammatoires qui stimulent leur potentiel immunomodulateur et maximisent leur intérêt clinique.

Mots clés : Cellules souches mésenchymateuses, polyarthrite rhumatoïde, immunomodulation, inflammation, liquide synovial, modèle K/BxN, modèle K/BxN-STA

# Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune inflammatory disease characterized by chronic synovitis that leads to bone erosion and cartilage degeneration. Despite the presence of therapeutic strategies capable of managing disease progression, there is currently no cure available. Adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSC) have been successfully shown to have immunomodulatory abilities both *in vitro* and in animal models of RA. However, this effect has yet to be efficiently translated in clinical settings. In the present study, we aimed to define how inflammation could play part in dictating the therapeutic efficiency of ADSC through either (i) a translational approach by using synovial fluids from RA patients (RASf) or (ii) by studying the effect of ADSC injections in two different RA experimental models. Here, we show that pro-inflammatory RASf preserve ADSCs' proliferative capacity and phenotype and up-regulates the gene expression of COX-2, IDO, IL-6, TSG6, ICAM-1, VCAM-1 and PD-L1 which are all involved in the immunomodulatory potential of ADSC. We demonstrate that RASf effect is directly mediated by TNF/ NF- $\kappa$ B signaling pathway and partially by IL-6. Moreover, pre-treating ADSC with inflammatory RASf functionally enhances their ability to alter pro-inflammatory markers in macrophages (CD40 and CD80) and induce regulatory T cells (Tregs). *In vivo*, ADSC worsened disease progression in the K/BxN serum transfer arthritis model when injected intraperitoneally as a preventive protocol but did not have any effect on arthritic scores when injected as a therapeutic protocol. Only when ADSC were injected intra-articularly did we observe protective effects on the progression of arthritis. Altogether, this work puts forward the influence of the local inflammatory environment on ADSC therapeutic effects and suggests a direct delivery to sufficiently inflamed sites in order to properly prime their immunomodulatory potential and maximize their clinical benefits.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells, rheumatoid arthritis, immunomodulation, inflammation, synovial fluid, K/BxN model, K/BxN-STA model

# Table des matières

<b>Liste des figures .....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>3</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>4</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>8</b>
Chapitre 1. La polyarthrite rhumatoïde .....	9
1. Généralités .....	9
1.1. Etiologie .....	10
1.2. Diagnostic.....	12
2. Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde .....	13
2.1. Evolution de la PR .....	13
2.2. Immunité innée.....	15
2.2.1. Rôle des macrophages .....	18
2.3. Immunité adaptative .....	23
2.3.1. Rôle des lymphocytes T.....	24
2.4. Destruction articulaire .....	28
2.4.1. La membrane synoviale .....	28
2.4.2. Le liquide synovial .....	31
2.4.2.1. Cellules et cytokines impliquées.....	32
2.4.3. Destruction cartilagineuse et osseuse .....	34
3. Thérapies de la polyarthrite rhumatoïde .....	36
3.1. Les traitements traditionnels.....	36
3.2. Les biothérapies .....	37
3.2.1. Biothérapies ciblant les cytokines inflammatoires.....	38
3.2.2. Biothérapies ciblant les cellules .....	39
3.3. Les DMARDs synthétiques ciblés .....	40
3.4. La thérapie cellulaire.....	40

Chapitre 2. Les cellules souches mésenchymateuses .....	43
1. Généralités sur les cellules souches .....	43
2. Les cellules souches mésenchymateuses.....	45
2.1. Histoire.....	45
2.2. Définition .....	46
2.3. Sources.....	47
2.4. Propriétés.....	48
2.4.1. Rôle anti-fibrotique .....	49
2.4.2. Rôle anti-apoptotique .....	50
2.4.3. Rôle pro-angiogénique .....	50
2.4.4. Autres rôles trophiques .....	51
2.5. Potentiel immunomodulateur .....	51
2.5.1. Interactions avec les cellules immunitaires.....	53
2.5.1.1. Interactions avec les lymphocytes T .....	53
2.5.1.2. Interactions avec les lymphocytes B.....	55
2.5.1.3. Interactions avec les macrophages .....	56
2.5.1.4. Interactions avec les cellules dendritiques.....	57
2.5.1.5. Interactions avec les polynucléaires neutrophiles .....	58
2.5.1.6. Interactions avec les cellules natural killer .....	58
2.5.2. Influence du microenvironnement.....	61
2.5.2.1. Conditions de culture.....	61
2.5.2.2. Rôles des ligands des récepteurs Toll-like .....	62
2.5.2.3. Rôle du microenvironnement inflammatoire.....	63
Chapitre 3. Les cellules souches mésenchymateuses en application préclinique et clinique .....	66
1. Effet dans les modèles précliniques de maladies auto-immunes.....	66
1.1. Effet dans les modèles précliniques de polyarthrite rhumatoïde .....	69
1.1.1. Etat de l'art .....	69
1.1.2. Méthodes utilisées pour améliorer le potentiel thérapeutique des MSC in vivo .....	74

1.1.2.1. Pré-conditionnement avec des cytokines pro-inflammatoires .....	74
1.1.2.2. Sécrétome et vésicules extracellulaires.....	74
1.1.2.3. Modification génétique .....	75
2. Essais cliniques dans les maladies auto-immunes .....	77
2.1. Essais cliniques dans la polyarthrite rhumatoïde .....	78
<b>Objectifs de la thèse .....</b>	<b>81</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>84</b>
Partie I .....	85
Article: Rheumatoid Synovial Fluids Regulate the Immunomodulatory Potential of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Through a TNF/NF- $\kappa$ B-Dependent Mechanism .....	85
Résultats complémentaires .....	110
Partie II .....	112
Effet différentiel des injections d'ADSC dans les modèles d'arthrite expérimentale K/BxN et K/BxN-STA.....	112
Introduction : .....	112
Matériels et méthodes :.....	113
Résultats et discussion:.....	117
Conclusion:.....	125
<b>Discussion générale et perspectives.....</b>	<b>126</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>137</b>



# Liste des figures

- Figure 1 Les manifestations de la PR
- Figure 2 Etiologie de la PR
- Figure 3 Physiopathologie de la PR
- Figure 4 L'activation de l'immunité innée par les PAMPs et DAMPs
- Figure 5 Rôles pro et anti-inflammatoires des cellules dendritiques en réponse à différents stimulus
- Figure 6 Les mécanismes impliqués dans l'activation des macrophages dans la PR
- Figure 7 La contribution des monocytes non-classiques Ly6c- dans le modèle K/BxN-STA
- Figure 8 Rôle des macrophages dans la physiopathologie de la PR
- Figure 9 Phénotype et fonction des différents sous-types de macrophages
- Figure 10 Physiopathologie de la PR et rôle de l'immunité adaptative
- Figure 11 Les sous-populations différentes de LT auxiliaires
- Figure 12 L'activation des LT synoviaux dans la PR
- Figure 13 Deux sous-populations de synoviocytes contribuent à la destruction articulaire au cours de la PR
- Figure 14 Rôle des FLS au cours de la PR
- Figure 15 La résorption osseuse au cours de la PR
- Figure 16 Les DMARDs utilisés dans la prise en charge de la PR
- Figure 17 Le transfert adoptif de Tregs pour induire la tolérance immunitaire
- Figure 18 Les propriétés des cellules souches
- Figure 19 Les différentes classes des cellules souches
- Figure 20 Les sources des MSC
- Figure 21 Les mécanismes impliqués dans le rôle trophique des MSC
- Figure 22 Les propriétés immunomodulatrices des MSC
- Figure 23 Les interactions des MSC avec les LT
- Figure 24 Les interactions des MSC avec les macrophages
- Figure 25 Mécanisme proposé pour l'interaction des MSC avec les TLR3 et TLR4
- Figure 26 La plasticité du potentiel immunomodulateur des MSC

- Figure 27 Phase effectrice du modèle K/BxN-STA dépendante de l'immunité innée
- Figure 28 Méthodes proposées pour améliorer le potentiel thérapeutique des MSC
- Figure 29 Eléments clés à prendre en compte pour l'amélioration clinique des MSC
- Figure 30 Le conditionnement des ADSC par des RASF pro-inflammatoires augmente leur capacité à induire des Tregs
- Figure 31 Les protocoles d'injections d'ADSC dans les modèles K/BxN et K/BxN-STA
- Figure 32 Les ADSC inhibent la prolifération des splénocytes
- Figure 33 Les ADSC induisent l'expression des gènes pro-résolutifs dans les BMDM
- Figure 34 Les ADSC n'ont aucun effet sur la progression d'arthrite dans le modèle de souris K/BxN
- Figure 35 Les ADSC aggravent l'arthrite dans le modèle K/BxN-STA quand injectées en protocole préventif
- Figure 36 Les ADSC n'ont aucun effet sur l'arthrite dans le modèle K/BxN-STA quand injectées en protocole thérapeutique
- Figure 37 L'injection des ADSC par voie IA inhibe l'arthrite dans le modèle K/BxN-STA quand injectées en protocole thérapeutique
- Figure 38 L'adressage des MSC aux sites inflammatoires maximisent leur intérêt clinique

# Liste des tableaux

Tableau 1	Critères ACR/EULAR 2010 pour la classification de la PR
Tableau 2	Evaluation clinique de l'activité de la PR en se basant sur le DAS28
Tableau 3	Caractéristiques des différents types de SF
Tableau 4	Fonctions et concentrations des cytokines du SF
Tableau 5	Marqueurs extracellulaires des MSC
Tableau 6	Récapitulatif des médiateurs essentiels à l'effet immunomodulateur des MSC
Tableau 7	Effet des MSC dans des modèles précliniques de GvHD et de maladies auto-immunes
Tableau 8	Effet des MSC dans des modèles précliniques de PR
Tableau 9	Effet des MSC dans les essais cliniques de PR
Tableau 10	Liste des primers étudiés

## Liste des abréviations

ACPA	Auto-anticorps anti-peptides citrullinés
ACR/EULAR	American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism
ADSC	Cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux
AIA	Arthrite induite par l'antigène
APC	Cellules présentatrices d'antigène
Arg-1	Arginase-1
bDMARDs	Biological disease-modifying anti-rheumatic drugs
bFGF	Basic-fibroblast growth factor
BMSC	Cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse
BMDM	Macrophages dérivés de la moelle osseuse
CAIA	Arthrite induite par des anticorps anti-collagène
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
cDC	Cellules dendritiques conventionnelles
CFU-f	Colony forming units-fibroblast
CIA	Arthrite induite au collagène
COX-2	Cyclooxygénase-2
CSF1-R	Colony stimulating factor 1 receptor
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
CX3CL	Chemokine (C-X3-C motif) ligand
CX3CR	Chemokine (C-X3-C motif) receptor
DAMPs	Damage-associated molecular Patterns
DAS28	Disease Activity Score-28
DC	Cellules dendritiques
DMARD	Disease-modifying anti-rheumatic drugs
EAE	Experimental autoimmune encephalomyelitis
ESR	Vitesse de sédimentation

FAP $\alpha$	Fibroblast activating protein- $\alpha$
Fc $\gamma$ R	Fc $\gamma$ receptor
FGF	Fibroblast growth factor
FLS	Fibroblasts-like synoviocytes
Foxp3	Forkhead box p3
G6PI	Glucose-6-phosphate isomérase
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GvHD	Réaction du greffon contre l'hôte
HGF	Hepatocyte growth factor
HLA	Human leukocyte antigen
HIF-1	hypoxia-inducible factor 1
IBD	Inflammatory bowel disease
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IDO	Indoleamine-1,2-dioxygénase
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
ILC	Innate lymphoid cells
IL-1RA	IL-1 Receptor Antagonist
iNOS	Inducible-nitric oxyde
iPSC	Cellules souches pluripotentes induites
ISCT	Société internationale de thérapie cellulaire
iTregs	Lymphocyte T régulateur induit
JAK/STAT	Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
KO	Knock-out
LB	Lymphocytes B
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocytes T

LtxA	Leucotoxine A
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MerTK	Mer tyrosine kinase
MG	Myasthénie grave
MHC-II	Major Histocompatibility Complex II
miRNA	Micro RNA
MMP	Métalloprotéases matricielles
mRNA	Messenger RNA
MSC	Cellules souches mésenchymateuses
NF-κB	Nuclear factor-κB
NK	Natural killer
NO	Oxyde nitrique
NOD	Non-Obese Diabetic
NR4A1	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1
nTreg	Lymphocyte T régulateur naturel
O <sub>2</sub>	Dioxygène
PAD	Peptidylarginine déiminase
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PD-1	Programmed cell death protein-1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PNN	Polynucléaires neutrophiles
PPARβ/δ	Peroxisome proliferator activated-receptor β/γ
PR	Polyarthrite rhumatoïde
PRR	Pattern recognition receptor
RANKL	Receptor activation of nuclear factor κ-B ligand
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted
RASF	Liquide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde

RF	Facteurs rhumatoïdes
RNA-seq	RNA sequencing
ROR $\gamma$ t	Retinoid acid-related orphan receptor gamma t
ROS	Reactive-oxygen species
scRNA-seq	Single-cell RNA sequencing
SF	Liquide synovial
SFMC	Cellules mononucléées du liquide synovial
sHLA-G	Soluble human leukocyte antigen-G
SLE	Lupus érythémateux disséminé
SSc	Sclérodémie systémique
STC-1	Stanniocalcine-1
Tfh	T follicular helper
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
Th	Lymphocytes T helper
Thy-1	Thymus cell antigen-1
TIMP	Inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases matricielles
TLR	Récepteur Toll-like
TNF	Tumor necrosis factor
tolDC	Cellules dendritiques tolérogènes
Tph	T peripheral helper
Tr1	Type 1 regulatory cells
Treg	Lymphocytes T régulateurs
TSG-6	Tumor-necrosis factor stimulated gene-6
UV	Ultraviolet
UC-MSC	Cellules souches mésenchymateuses dérivées du cordon ombilical
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	Wild type

---

# Introduction

---



# Chapitre 1. La polyarthrite rhumatoïde

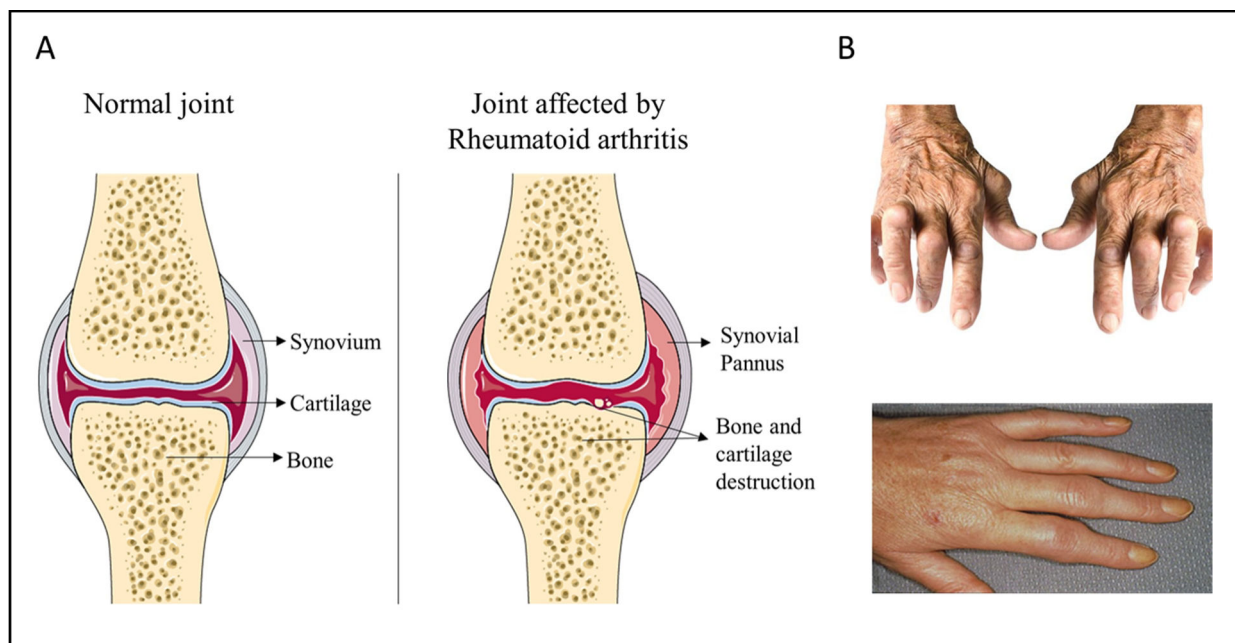
## 1. Généralités

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires avec une prévalence qui varie entre 0.5 à 1% de la population mondiale. Elle touche les adultes âgés généralement entre 40 et 60 ans mais peut se manifester à tout âge et est trois fois plus fréquente chez les femmes que les hommes (1,2).

Il s'agit d'une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation articulaire chronique résultante d'un dérèglement du système immunitaire et une production de facteurs rhumatoïdes (RF) et surtout d'auto-anticorps anti-peptides citrullinés (ACPA) (3).

La PR évolue par poussées et se manifeste par une inflammation et une hypertrophie de la membrane synoviale appelée « pannus » synovial. Cette synovite rhumatoïde est caractérisée d'une part par une hyperactivité des synoviocytes macrophagiques et fibroblastiques accompagnée d'une production excessive de liquide articulaire riche en médiateurs solubles pro-inflammatoires et d'autre part par une infiltration importante de cellules de l'immunité innée et adaptative. Le pannus devient ainsi le siège d'une destruction cartilagineuse et osseuse provoquant des douleurs, gonflements et déformations au niveau des articulations (3,4) (**Figure 1**).

Bien que la PR touche principalement les petites articulations symétriques des mains et des pieds, d'autres manifestations extra-articulaires, notamment cardiovasculaires et squelettiques, augmentent le risque de comorbidités associées à la maladie (5).



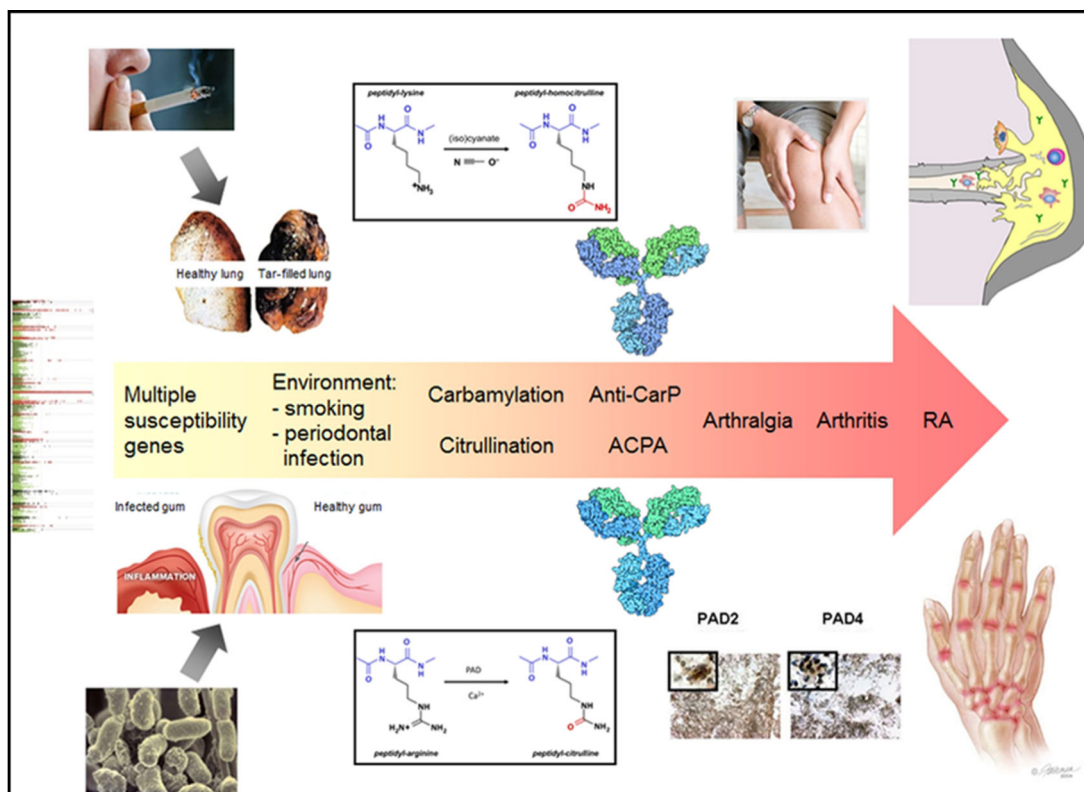
**Figure 1. Les manifestations de la PR.** (A) La PR se caractérise par une prolifération de la membrane synoviale (pannus synovial) qui aboutit à une dégradation cartilagineuse et osseuse et se manifeste par (B) des gonflements et déformations au niveau de l'articulation. Photos issues de (6,7).

## 1.1. Etiologie

L'étiologie de la PR n'a jamais pas été clairement identifiée. Cependant, il est admis que plusieurs facteurs génétiques et environnementaux contribuent à son développement (8). En effet, le risque de transmission héréditaire compte pour 40 à 65% chez les individus séropositifs pour RF ou ACPA (9). Une association a été établie entre les allèles *HLA-DRB1* contenant une séquence d'acides aminés appelée épitope partagé et l'incidence ainsi que la sévérité de la PR (10). D'autres allèles de risque ont été identifiés au cours des années et incluent les allèles codant l'activation et la différenciation des lymphocytes tels que *PTPN22* et *CTLA-4* mais aussi les polymorphismes des gènes *PADI4* responsable de la citrullination de peptides et *STAT4* impliqué dans la signalisation de l'interleukine (IL)-12 et l'IL-4, ainsi que *IRF5* impliqué dans la polarisation des macrophages pro-inflammatoires (11–15). Les modifications épigénétiques confèrent de même une susceptibilité à la PR à la suite de la méthylation d'ADN comme démontré par Liu *et al.* qui ont identifié 9 méthylations au niveau de la région HLA (human leukocyte antigen G-5), l'acétylation modifiée des histones et l'expression des microRNA (miRNA) comme par exemple

le miR-203 qui contribue au développement de la maladie par l'induction de l'expression de MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) et IL-6 (16,17).

En ce qui concerne les facteurs environnementaux, il a été démontré que le tabagisme et le stress bronchial promouvaient la citrullination des protéines de la muqueuse augmentant ainsi le risque de développer une PR (8,18). Certains agents infectieux pourraient également jouer un rôle déclencheur dans la PR tels que les bactéries impliquées dans les maladies parodontales : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* capable d'induire une hypercitrullination cellulaire dans les neutrophiles par la sécrétion de la leucotoxine (LtxA) et *Porphyromonas gingivalis* qui exprime son propre isoforme de la peptidylarginine déiminase (PAD), d'où le rôle non négligeable du microbiote dans le développement de la PR (19,20). Des infections virales telles que l'Epstein-Barr et le Cytomégalo virus ont été également associés à la PR et ce, possiblement par mimétisme moléculaire (21,22) (Figure 2).



**Figure 2. Etiologie de la PR.** Des facteurs génétiques et environnementaux ainsi que des modifications épigénétiques et post-translacionnelles (citrullination et carbamylation) contribuent à un dérèglement du système immunitaire et prédisposent les individus à développer une PR (23).

## 1.2. Diagnostic

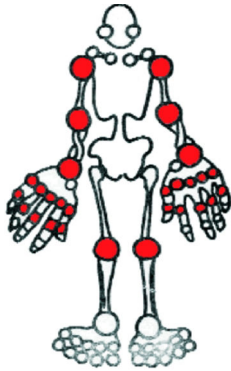
Durant les phases cliniques, le diagnostic et l'évaluation de la PR chez les patients s'effectue selon les critères de l'ACR/EULAR 2010 (American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism) (**Tableau 1**) en se basant sur des manifestations cliniques et sérologiques et sur le DAS28 (Disease Activity Score-28) (24).

Joint involvement (0-5)	
1 large joint	0
2-10 large joints	1
1-3 small joints (large joints not counted)	2
4-10 small joints (large joints not counted)	3
> 10 joints (at least one small joint)	5
Serology (0-3)	
Negative RF AND negative ACPA	0
Low-positive RF OR low-positive ACPA	2
High-positive RF OR high-positive ACPA	3
Symptoms duration (0-1)	
< 6 weeks	0
≥ 6 weeks	1
Acute phase reactants (0-1)	
Normal CRP AND normal ESR	0
Abnormal CRP OR abnormal ESR	1

**Tableau 1. Critères ACR/EULAR 2010 pour la classification de la PR. Adapté de (24).**

Le DAS28 est un indice de l'activité de la PR qui prend en compte différents paramètres : l'appréciation globale du patient sur une échelle visuelle, le nombre d'articulations douloureuses et gonflées (sur les 28 articulations proposées par l'EULAR) et la valeur de la vitesse de sédimentation (DAS28-ESR) ou du taux de la protéine C-réactive (DAS28-CRP). Une valeur DAS-28 inférieure à 2,6 est définie comme une PR en rémission ou une absence d'activité alors que

toute valeur supérieure à 2,6 reflète une activité faible, modérée ou forte. L'interprétation clinique des valeurs de DAS-28 variant entre 0 et 10 est présentée dans le **tableau 2** ci-dessous (25).



DAS28	Interprétation Clinique
< 2,6	PR en rémission
2,6 à 3,2	PR faiblement active
3,2 à 5,1	PR modérément active
> 5,1	PR fortement active

**Tableau 2. Evaluation clinique de l'activité de la PR en se basant sur le DAS28** (26).

## 2. Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde

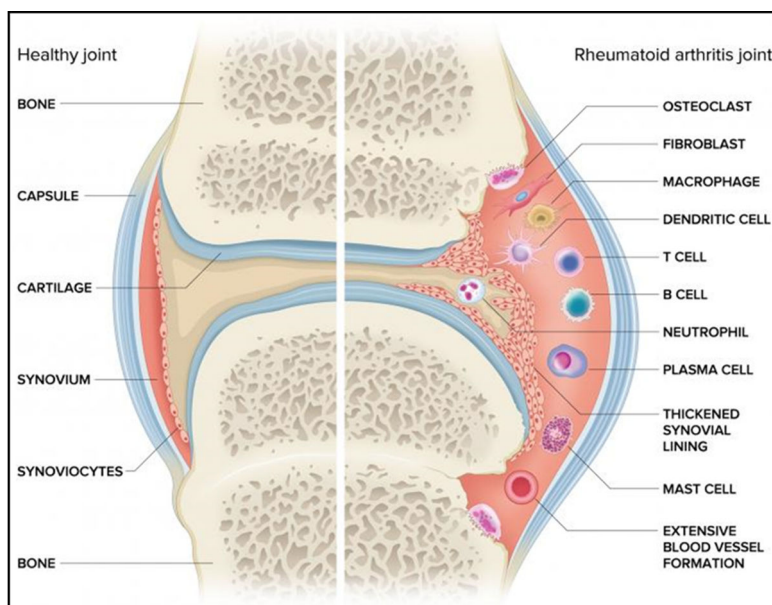
### 2.1. Evolution de la PR

Malgré l'hétérogénéité de l'évolution de la PR selon les patients, celle-ci peut être divisée en trois étapes distinctes : une phase pré-clinique asymptomatique, une phase clinique débutante et une phase clinique établie (27).

Phase pré-clinique : Le processus menant au développement de la PR peut commencer bien des années avant l'apparition de manifestations cliniques. Chez les individus génétiquement prédisposés, des facteurs environnementaux contribuent à une rupture éventuelle de la tolérance immunitaire (27). Cette rupture peut être expliquée par une conversion post-traductionnelle de résidus d'arginine en résidus de citrulline par les deux isoformes de l'enzyme PAD, PAD2 et PAD4 dans un processus calcium-dépendant appelé citrullination (18). L'hyperactivité des PADs devient donc à l'origine des quantités abondantes de protéines citrulinées retrouvées dans le liquide articulaire et au niveau des surfaces mucosales (28,29). La citrullination ainsi que d'autres modifications post-traductionnelles telles que la carbamylation

entraînent la production d'auto-anticorps y compris les ACPA dirigés contre les protéines citrullinées (vimentine,  $\alpha$ -énolase, fibrinogène) et les RF dirigés contre les immunoglobulines G (IgG) (23,30). Cela résulte en la formation de complexes immuns et le déclenchement d'un processus inflammatoire complexe qui sera détaillé davantage dans les pages qui suivent.

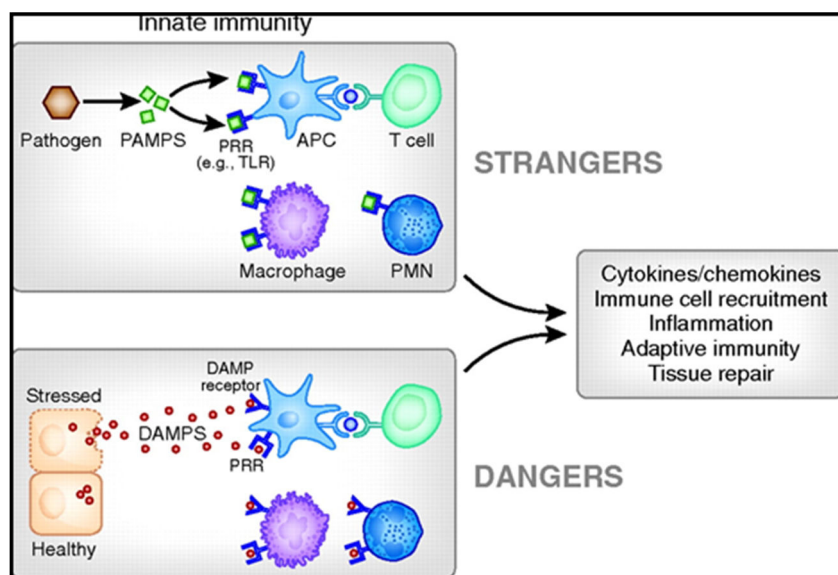
Phase clinique débutante et établie : La membrane synoviale normale revête la face interne de la capsule articulaire et est composée de deux couches (la sub-intima, couche profonde en contact direct avec la capsule et l'intima, couche cellulaire bordante). Au cours d'une PR débutante, cette membrane devient hyperplasique et infiltrée par des cellules de l'immunité innée (polynucléaires neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques, mastocytes) et de l'immunité adaptative (lymphocytes T et B), accompagnée d'une activation de cellules stromales et une néovascularisation (**Figure 3**). Ces cellules, ainsi que les auto-anticorps, contribuent à la production de métalloprotéases matricielles (MMP), cytokines pro-inflammatoires et chimiokines. La membrane synoviale adapte ainsi un phénotype invasif pseudo-tumoral induisant une destruction articulaire (31,32). En absence de résolution d'inflammation, cette phase est qualifiée d'une PR établie (27).



**Figure 3. Physiopathologie de la PR.** La membrane synoviale normale tapisse la couche interne de l'articulation et est composée de deux couches (a). Au cours d'une PR établie, l'articulation est caractérisée par la formation d'un pannus synovial et une infiltration leucocytaire excessive des cellules immunitaires innées et adaptatives (b). Adapté de (31).

## 2.2. Immunité innée

L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes. Il s'agit d'une réponse immunitaire non-spécifique activée à la suite de la reconnaissance de motifs spécifiques aux agents pathogènes conservés au cours de l'évolution, comme les ligands endogènes nommés DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) ou encore, les dérivés microbiens nommés PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Ces motifs sont reconnus par les PRR (Pattern Recognition Receptors) exprimés à la surface des APC (cellules présentatrices d'antigène) et activent des voies de signalisation qui déclencheront à leur tour une cascade de réponses cellulaires et activeront l'immunité adaptative (**Figure 4**). Les PRR regroupent quatre familles différentes : les récepteurs Toll-like (TLRs), les récepteurs lectines de type C (CLR), les récepteurs Nucleotide-binding oligomerization domain-like (NLR) et les récepteurs Retinoic acid-Inducible Gene I-like (RLR) (33–35).



**Figure 4. L'activation de l'immunité innée par les PAMPs et DAMPs.** Les PRR, tels que les TLR, exprimés à la surface des APC reconnaissent les PAMPs et DAMPs et activent l'immunité innée qui sera suivie d'une inflammation et l'activation de l'immunité adaptative (34).

Au cours de la PR, et par l'intermédiaire de ces différents mécanismes, l'immunité innée joue un rôle central dans l'initiation et la persistance de l'inflammation. En effet, les macrophages, cellules dendritiques (DC), cellules natural killer (NK) et mastocytes sont toutes retrouvées au

sein de la synoviale rhumatoïde inflammatoire tandis que les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont plutôt centrés au niveau du liquide articulaire (27) (**Figure 3**).

L'usage des modèles expérimentaux d'arthrite a permis d'élucider davantage le rôle effecteur de chacune de ces cellules. Le modèle murin d'arthrite induite par transfert de sérum K/BxN (K/BxN-STA) en est un exemple important. Comme ce modèle est relativement indépendant des lymphocytes T et B, il sert d'un bon exemple pour disséquer la phase effectrice de l'arthrite murine et l'immunité innée (36).

Les **PNN** sont activés dans l'articulation à la suite du dépôt de complexes immuns qui engagent le FcγR (Fcγ receptor) exprimés à leur surface. Leur activation est suivie par une sécrétion de molécules cytotoxiques, granules enzymatiques et cytokines pro-inflammatoires tous impliqués dans l'activation des autres cellules immunitaires contribuant ainsi à la destruction articulaire. Les PNN circulants des patients atteints de PR sont différents de ceux des individus sains tant au niveau génomique que protéique (37,38). En effet, les PNN de patients atteints de PR sont plus susceptibles à la production de ROS (reactive-oxygen species) et à une apoptose retardée à cause de la présence de molécules anti-apoptotiques dans l'environnement, notamment le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) et l'IL-8 (39,40). La NETose, processus de mort cellulaire des PNN utilisé pour éliminer les pathogènes, constitue de même une source supplémentaire d'autoantigènes citrullinés au cours de la PR (41). Ce rôle important des polynucléaires neutrophiles dans la phase effectrice de l'arthrite a été également confirmé dans le modèle K/BxN-STA où les souris déplétées de PNN étaient complètement résistantes au développement d'arthrite après transfert de sérum K/BxN (42).

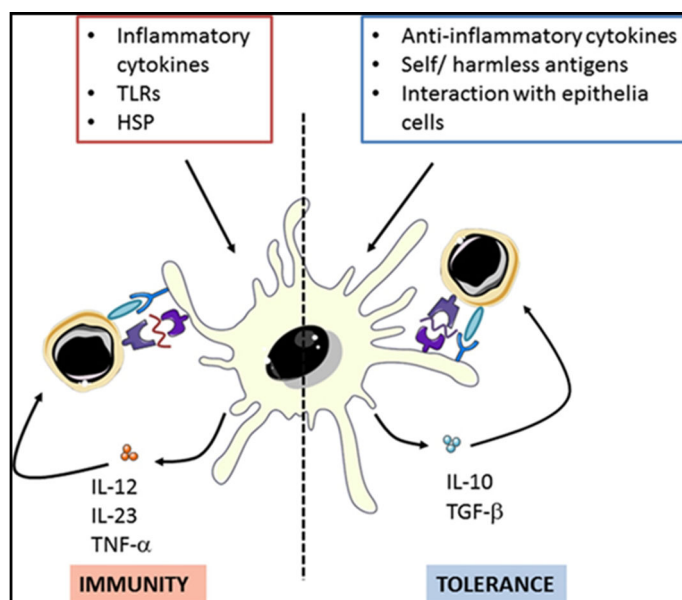
Les **mastocytes** sont de même activés suite à la formation de complexes immuns et produisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, chimiokines mais aussi des médiateurs vasoactifs qui améliorent l'accès des auto-anticorps à l'articulation (36,43).

Les **cellules dendritiques** jouent leur part en infiltrant le tissu et liquide synovial et présentant les antigènes localement activant ainsi la réponse immunitaire adaptative (44). En effet, les cellules dendritiques migrent vers l'articulation sous l'influence des chimiokines Fractalkine/CX3CL1 (chemokine (C-X3-C motif) ligand 1), CCL19 (chemokine (C-C motif) ligand



19), CCL21 et contribuent à l'inflammation soit par la sécrétion d'interféron de type I par les DC plasmacytoïdes soit par l'activation des lymphocytes T par les DC conventionnelles (cDC) qui expriment à leur surface les molécules de co-stimulation CD80/CD86 (45–47). Les cDC participent également à la polarisation des lymphocytes T en Th1 ou Th17 en sécrétant les cytokines IL-12 et IL-23, respectivement et au développement des auto-anticorps (48) (**Figure 5**). L'inhibition du CX3CL1 dans le modèle murin d'arthrite induit au collagène (CIA) diminue la sévérité de l'arthrite confirmant ainsi le rôle essentiel des DC dans la PR (49).

Les DC peuvent exercer d'une autre part un effet tolérogène dans la PR et induire une tolérance immunitaire par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires et par l'induction d'une anergie des lymphocytes T (48) (**Figure 5**). En effet, il a déjà été démontré que des DC tolérogènes générés *in vitro* inhibent le développement d'arthrite murine dans le modèle CIA par l'inhibition des lymphocytes Th17 et l'induction de lymphocytes T producteurs d'IL-10 (50).



**Figure 5. Rôles pro et anti-inflammatoires des cellules dendritiques en réponse à différents stimulus.** Les DC jouent un rôle pro-inflammatoire en activant et polarisant les lymphocytes T mais peuvent dans certaines conditions adopter un phénotype anti-inflammatoire et induire une tolérance immunitaire (48).

D'autres cellules de l'immunité innée jouent leur part dans la pathogenèse de la PR. Nous nommons en particulier les **cellules NK** et **lymphocytes  $\gamma\delta$**  par leur activité cytotoxique et leur

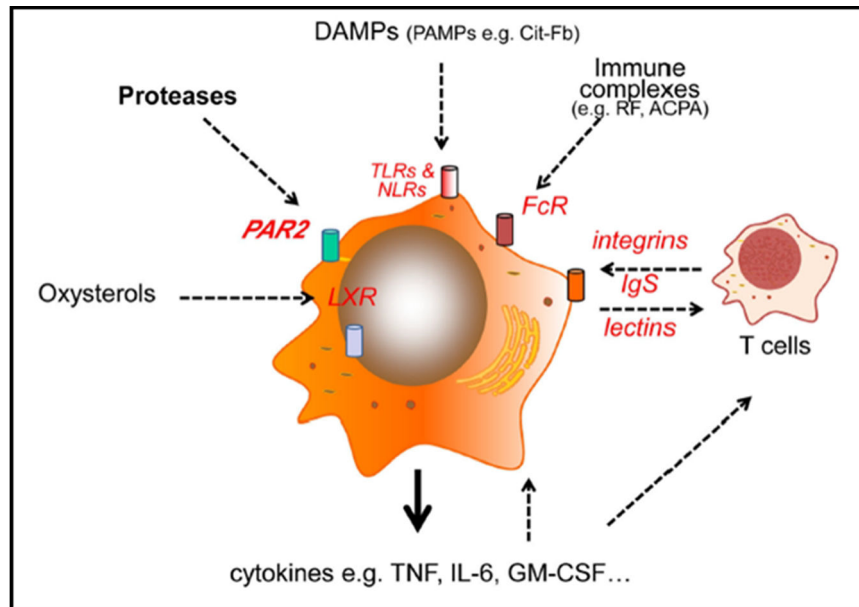
sécrétion de TNF (Tumor necrosis factor) et IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) ainsi que les cellules **ILC3** (Innate lymphoid cells 3) par leur production d'IL-17 et IL-22 (51,52). Cependant, les cellules qui contribuent primordialement à la PR restent les macrophages.

### 2.2.1. Rôle des macrophages

Les **macrophages** sont des acteurs majeurs de la physiopathologie de la PR. Ce sont les sources principales des cytokines pro-inflammatoires TNF, IL-6 et IL-1 qui ont un rôle central dans le maintien de l'inflammation (1). Le TNF en est d'une importance particulière puisque son inhibition thérapeutique induit une rémission dans 60% des patients atteints de PR (53).

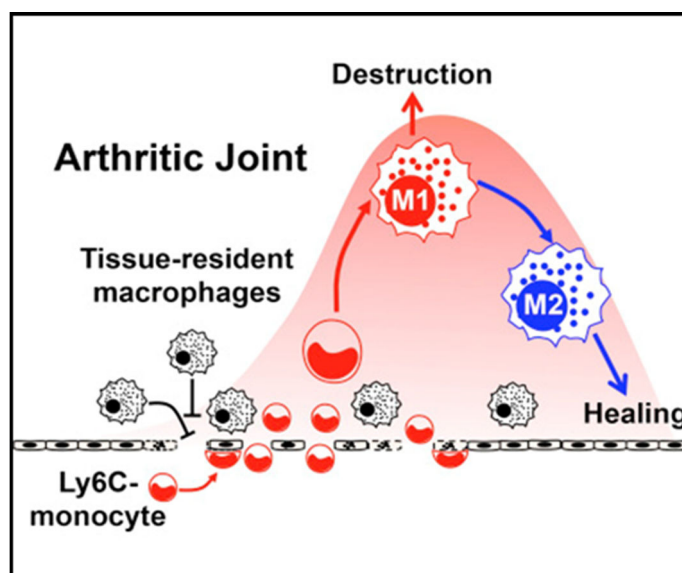
Les macrophages sont différenciés à partir de monocytes circulants qui infiltreront le site inflammatoire sous l'influence des chimiokines MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), CX3CL1 et IL-8 (54,55). Ils sont ensuite activés par différents mécanismes : un engagement des TLR2, TLR4, TLR3 et TLR6, une activation par les facteurs de croissance M-CSF ou GM-CSF, une activation Fc- $\gamma$ R-dépendante des auto-anticorps impliqués dans la PR ou une activation des Protease-Activated Receptor 2 (PAR2) par les sérines protéases présentes dans la membrane synoviale (4) (**Figure 6**).

Leur activation induit donc des fonctions cruciales pour l'élimination des pathogènes, mais qui jouent aussi un rôle dans la perpétuation de l'inflammation. Un rôle essentiel est leur capacité de présentation d'antigène qui active les cellules de l'immunité adaptative. La fonction la plus importante attribuée au macrophages reste cependant leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires accompagnée d'une capacité de phagocytose, de production de ROS, de facteurs angiogéniques tels que le VEGF (vascular endothelial growth factor) et FGF (fibroblast growth factor), de métalloprotéases matricielles (MMP-3, MMP-9 et MMP-12) mais aussi de chimiokines responsables de l'infiltration de monocytes et PNN tels que le MCP-1 et l'IL-8 (1,56–59).



**Figure 6. Les mécanismes impliqués dans l'activation des macrophages dans la PR.** L'engagement des TLRs, des Fc-γR, de PAR2 ou des récepteurs de GM-CSF induit l'activation des macrophages (4).

Dans le cas de la PR, une corrélation a été établie entre le nombre de macrophages synoviaux infiltrant l'articulation et l'activité ainsi que la sévérité de la PR (60). Parallèlement, le rôle crucial des macrophages dans le développement de l'arthrite murine a été démontré chez des souris BALB/c déplétés de macrophages qui étaient complètement résistantes au développement d'arthrite après transfert de sérum K/BxN (61). Dans ce même modèle, une infiltration de monocytes non-classiques Ly6c<sup>-</sup> dans l'articulation a été montrée comme un contributeur principal à l'arthrite inflammatoire. Ces monocytes se différencient dans l'articulation en macrophages pro-inflammatoires et dans un deuxième temps subissent une reprogrammation vers un phénotype anti-inflammatoire qui participe à la résolution de l'inflammation (62) (**Figure 7**). Cependant, une étude plus récente par Brunet *et al.* a mis en évidence que les souris NR4A1<sup>-/-</sup> (Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1) déficientes en monocytes Ly6c<sup>low</sup> développent une arthrite plus aggravée que les souris WT (wild type). Cela suggère que ce sont les monocytes classiques Ly6c<sup>high</sup>, et non pas Ly6c<sup>low</sup>, qui contribuent à l'initiation et la progression de l'arthrite dans le modèle K/BxN. De plus, ces mêmes travaux ont montré que les monocytes Ly6c<sup>low</sup> participent à la résolution de l'inflammation par la mobilisation de lymphocytes T régulateurs (Treg) (63).

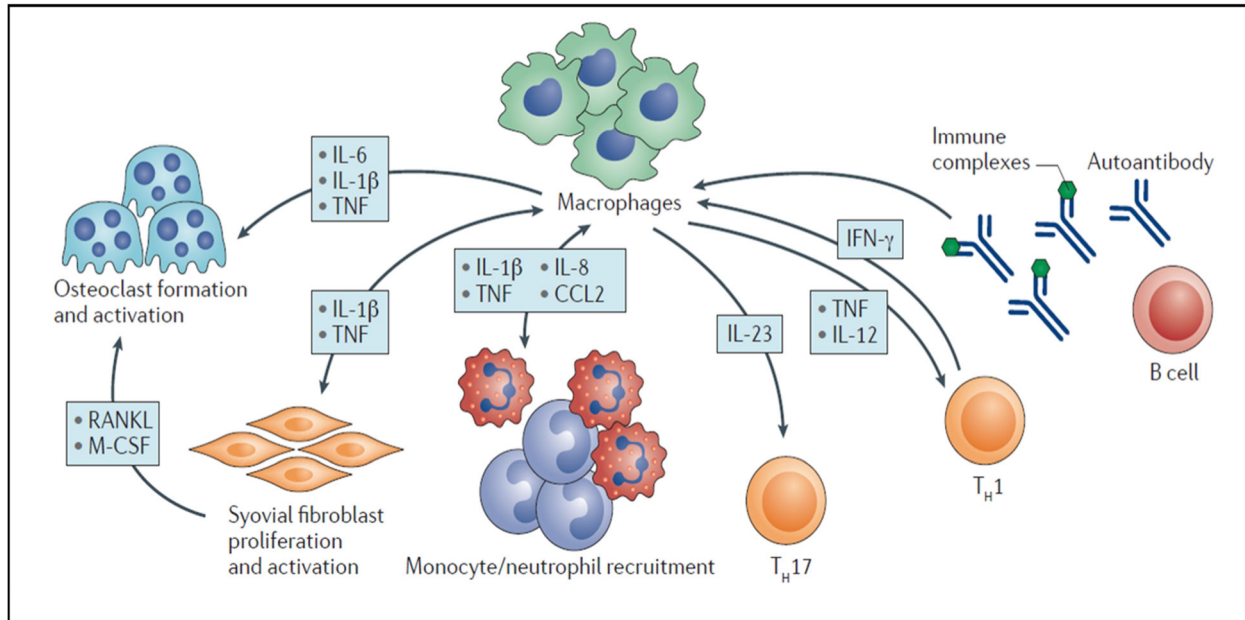


**Figure 7. La contribution des monocytes non-classiques Ly6c- dans le modèle K/BxN-STA.** Les monocytes non-classiques Ly6c<sup>-</sup> sont recrutées à l'articulation et transitionnent au cours de l'arthrite d'un phénotype pro-inflammatoire à un phénotype M2 pro-résolutif (62).

Ainsi, la synovite rhumatoïde est riche en macrophages pro-inflammatoires, schématiquement désignés dans la littérature comme des macrophages « classiques » de type M1 en référence à la dichotomie de la polarisation macrophagique M1/M2. Les macrophages de type M2 sont qualifiés à leur tour de macrophages « alternatifs » et ont, eux, des propriétés plutôt résolutives contribuant à l'homéostasie synoviale (64).

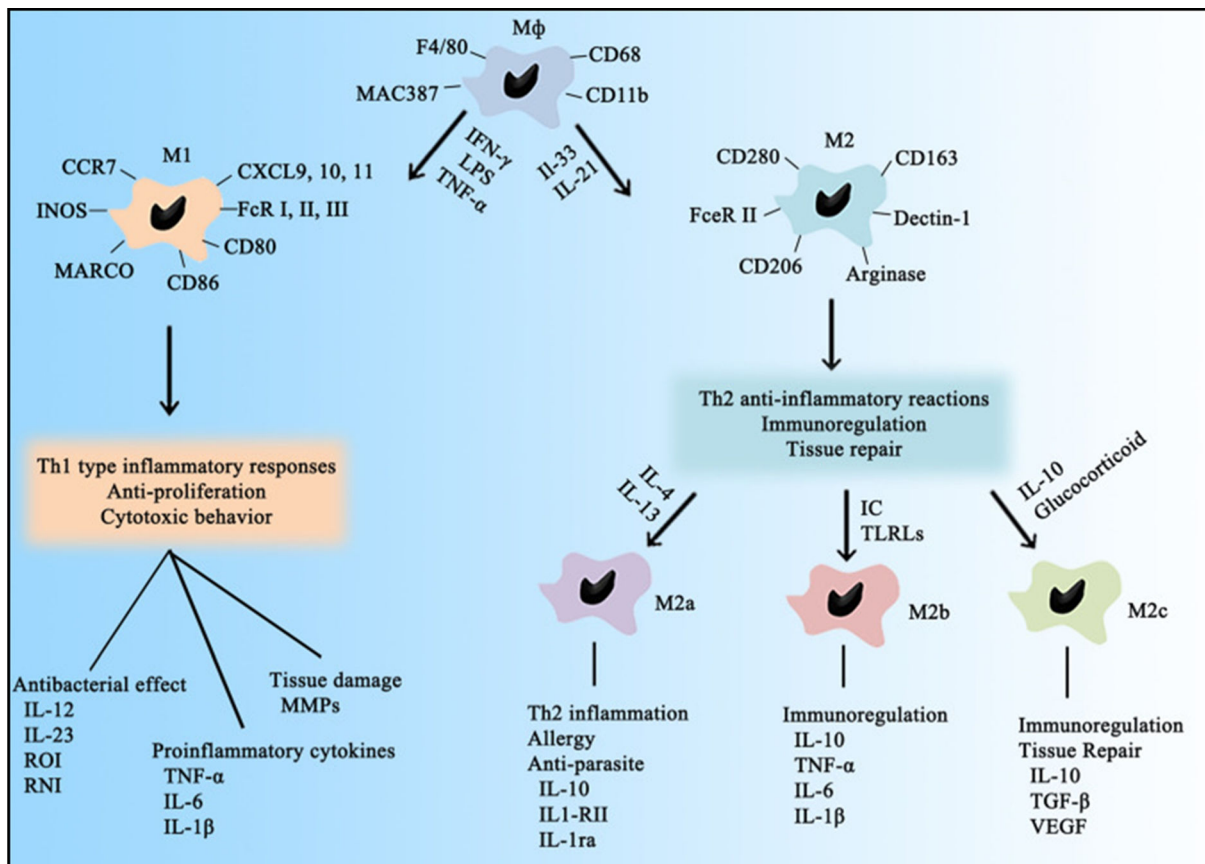
Les macrophages M1 pro-inflammatoires, comme mentionné précédemment, sont majoritairement issus de la différenciation des monocytes infiltrants et se localisent au niveau de la jonction articulaire et de la couche sub-intima (65). Ils expriment à leur surface les molécules MHC-II (Major Histocompatibility Complex II) et les molécules de co-stimulation CD40, CD80 et CD86 qui sont responsables de la présentation d'antigène et la co-stimulation des lymphocytes T respectivement (64,66,67). Outre leur capacité d'initier la réponse adaptative, les macrophages sont capables d'induire l'expansion et la différenciation des lymphocytes Th17 en produisant l'IL-23 (64). L'IL-1 et le TNF sécrétés par les macrophages M1 activent de même les fibroblastes synoviaux qui vont à leur tour sécréter du M-CSF et RANKL (Receptor activation of nuclear factor

$\kappa$ -B ligand) responsables de la génération des ostéoclastes et donc, de la destruction osseuse (68) (**Figure 8**).



**Figure 8. Rôle des macrophages dans la physiopathologie de la PR.** Les macrophages sécrètent des cytokines impliquées dans le recrutement de monocytes/PNN, la polarisation des lymphocytes T, l'activation des fibroblastes synoviaux et la génération d'ostéoclastes. Les cytokines inflammatoires et les complexes immuns produits par les lymphocytes B activent à leur tour les macrophages (64).

Par contraste aux macrophages infiltrants pro-inflammatoires qui ont un rôle central dans la PR, il existe dans la membrane synoviale des macrophages résidents dont le rôle n'a toujours pas été clairement défini. Ces macrophages sont associés à un phénotype plutôt immunorégulateur du fait de leur sécrétion des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et IL-1RA (IL-1 Receptor Antagonist) (69,70). Ils expriment à leur surface différents récepteurs tels que le récepteur au mannose CD206, le récepteur au fragment Fc des immunoglobulines CD16, le récepteur « scavenger » de l'hémoglobine CD163 et le Mer tyrosine kinase (MerTK) entre autres (71,72) (**Figure 9**). De plus, il a été récemment démontré qu'une sous-population de macrophages synoviaux résidents CX3CR1<sup>+</sup> (chemokine (C-X3-C motif) receptor 1) forme une barrière immunologique anti-inflammatoire qui protège les structures intra-articulaires par la formation de jonctions serrées d'une manière similaire aux cellules épithéliales (73).

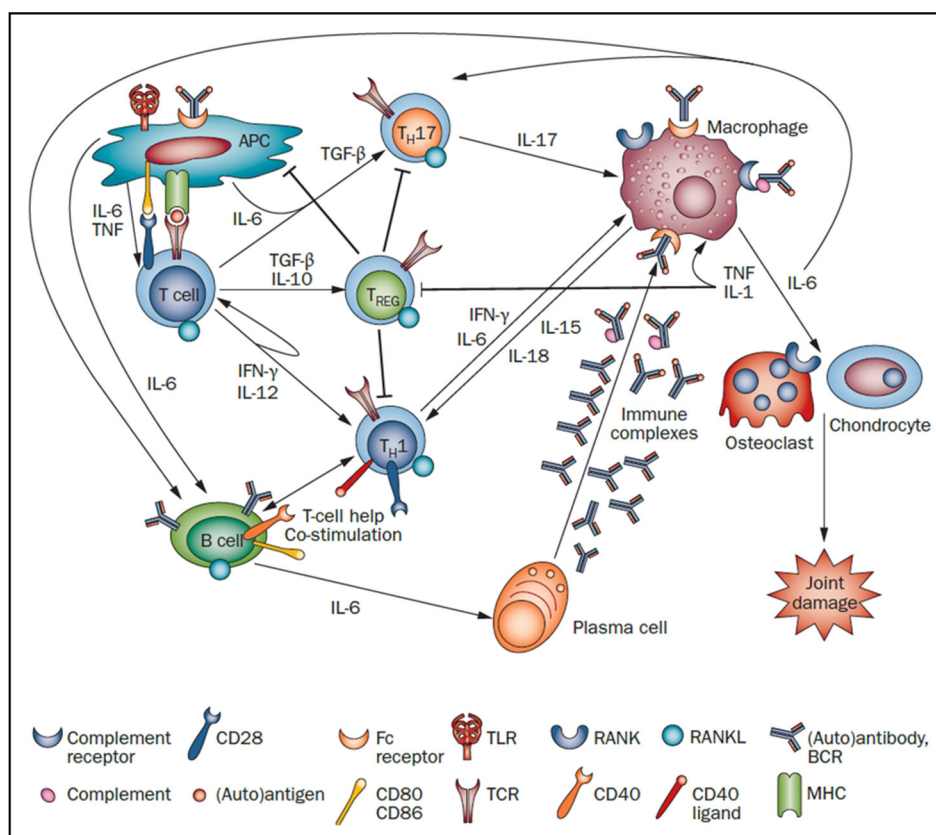


**Figure 9. Phénotype et fonction des différents sous-types de macrophages.** Sous l'influence de stimulus différents, les macrophages peuvent se polariser en différents phénotypes (M1 ou M2) chacun caractérisé par des fonctions et marqueurs extracellulaires précis (74).

Il est cependant important de souligner que les deux phénotypes M1/M2 ont été surtout caractérisées *in vitro* sous l'influence de stimulus précis tels que l'IFN-γ et LPS (lipopolysaccharide) pour les macrophages M1 et l'IL-4/IL-13, les complexes immuns/dérivés bactériens ou IL-10 pour les différents sous-types de macrophages M2 (M2a, M2b et M2c). La réalité dans l'articulation est différente avec la présence de plusieurs phénotypes intermédiaires co-exprimant les marqueurs M1 et M2 avec une évolution vers l'un ou l'autre phénotype en fonction du microenvironnement (74,75).

## 2.3. Immunité adaptative

L'immunité adaptative intervient secondairement à l'immunité innée et constitue une réponse hautement spécifique aux antigènes. Deux acteurs principaux en font partie : les lymphocytes B et les lymphocytes T. Les lymphocytes sont recrutés et activés par les APC à l'aide de signaux de stimulation cruciaux au bon développement de leur fonctions effectrices (76) **Figure 10).**



**Figure 10. Physiopathologie de la PR et rôle de l'immunité adaptative.** Les APC présentent les antigènes aux lymphocytes T qui vont se différencier en lymphocytes Th1 et Th17. Ces derniers activent les macrophages et aident les LB à produire des auto-anticorps et former les complexes immuns qui vont à leur tour induire la sécrétion de médiateurs inflammatoires par les macrophages (77).

Le rôle des **lymphocytes B** (LB) dans la physiopathologie de la PR a d'abord été suggéré par la présence des auto-anticorps tels que les RF produits par les plasmocytes, puis par la découverte des ACPA (78,79). En effet, la formation des complexes immuns active les macrophages et induit

leur production de médiateurs inflammatoires. Cependant, d'autres fonctions ont été attribuées depuis aux LB : Ce sont des APC qui stimulent et activent d'une part les lymphocytes T et secrètent d'autre part plusieurs cytokines inflammatoires tels que le TNF et l'IL-6. Les LB participent de même au remodelage osseux en favorisant l'ostéoclastogénèse (80–82) (**Figure 10**).

Il existe aussi une population de LB régulateurs producteurs d'IL-10. Ces derniers ont montré des effets bénéfiques dans l'inhibition de l'inflammation après leur transfert à des souris arthritiques (83) .

### **2.3.1. Rôle des lymphocytes T**

Les lymphocytes T (LT) sont d'une importance primordiale dans la pathogenèse de la PR. Il existe deux types de LT : les LT cytotoxiques CD8+ et les LT auxiliaires CD4+ (Th).

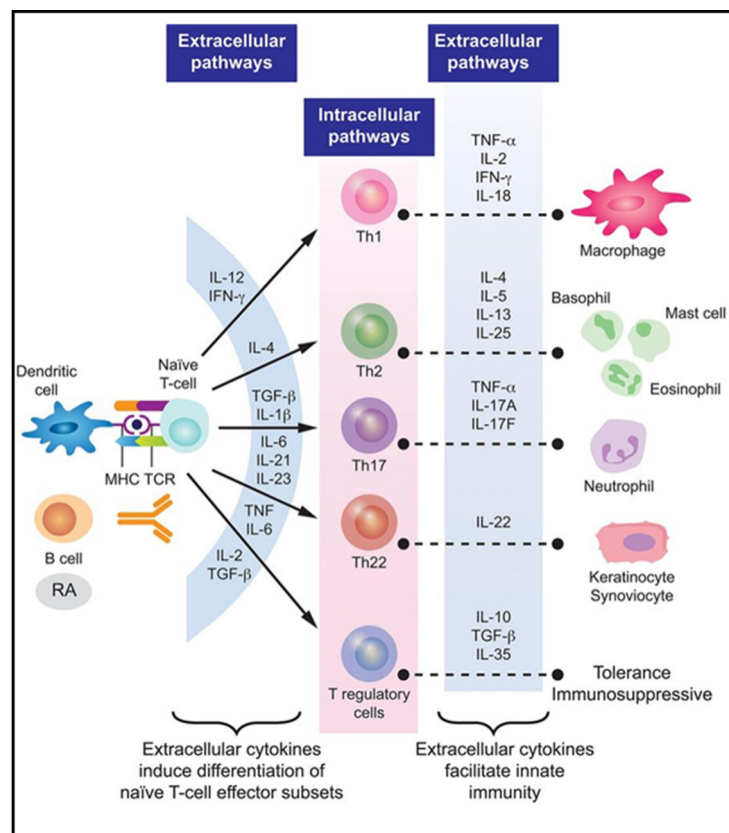
Les **LT cytotoxiques** sont caractérisés par une activité inflammatoire cytotoxique et induisent l'apoptose des cellules infectées de l'organisme (84). Leur contribution à la formation de centres germinaux dans la membrane synoviale de patients PR révèle un rôle potentiel dans l'initiation et le maintien de la maladie (85).

Les **LT auxiliaires** sont des acteurs majeurs dans le développement de la PR. Le déséquilibre entre les fonctions effectrices et régulatrices des LT auxiliaires est une des caractéristiques importantes de la PR. En effet, les LT auxiliaires sont activés à la suite d'une reconnaissance antigénique grâce au TCR (T cell receptor) exprimé à leur surface qui se lie au MHCII à la surface des APC (86) . Leur rôle principal est l'activation des autres cellules immunitaires notamment les LB et macrophages par la sécrétion de cytokines et chimiokines (77). Il existe plusieurs sous-types de Th qui sont caractérisées par des profils cytokiniques distincts : Les **lymphocytes Th1** sont des producteurs principaux d'IFN- $\gamma$ , IL-2 et TNF. Ils constituent une défense importante contre les pathogènes intracellulaires, virus et bactéries et ont longtemps été associés aux maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques et la PR (87–89). Les **lymphocytes Th2** produisent de leur part les cytokines anti-inflammatoires IL-4, IL-5 et IL-13 et participent à la réponse humorale contre



les pathogènes extracellulaires (87). Au cours de la PR, il existe un déséquilibre dans le ratio Th1/Th2 dans le sang périphérique des patients PR en faveur des cellules Th1 (88). La PR a donc été conventionnellement caractérisée comme étant une maladie médiée par les cellules Th1 à cause de la présence abondante de LT auto-réactifs ayant une signature Th1 dans le liquide articulaire et la membrane synoviale des patients (90).

Cependant, l'attention s'est tournée vers les **lymphocytes Th17** après leur caractérisation en 2005 (91). Les lymphocytes Th17 secrètent plusieurs cytokines pro-inflammatoires: principalement l'IL-17A mais aussi l'IL-17F, l'IL-21, l'IL-22 et le TNF. Outre les cytokines, les lymphocytes Th17 secrètent aussi des chimiokines et métalloprotéinases qui, ensemble, orchestrent l'inflammation tissulaire en recrutant les PNN vers le site inflammatoire et induisant une réponse immunitaire contre les champignons et bactéries extracellulaires (92–95) (**Figure 11**).



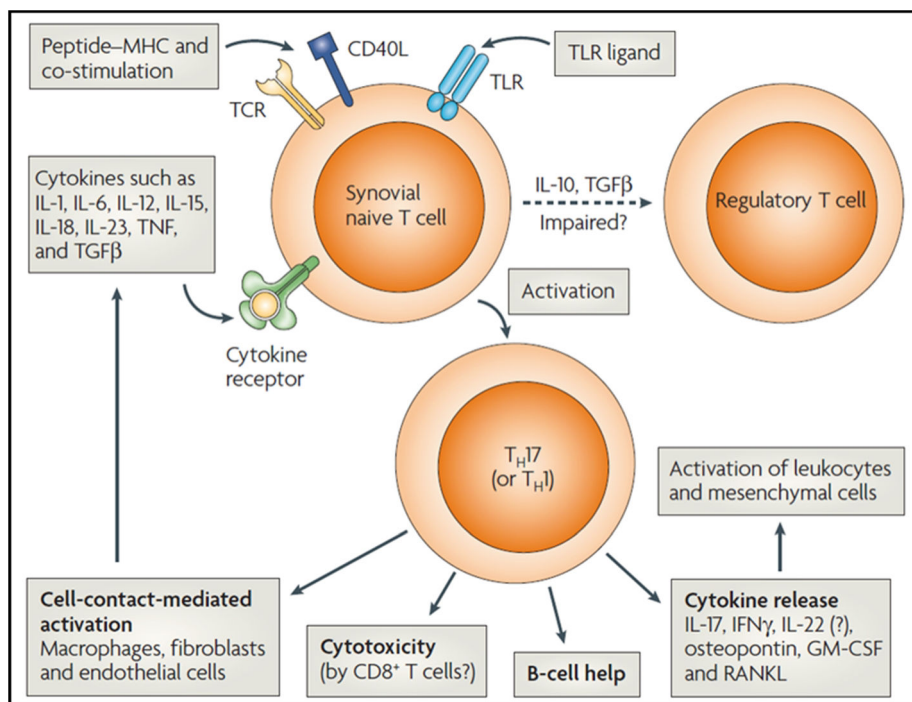
**Figure 11. Les sous-populations différentes de LT auxiliaires.** Il existe différents sous-types de lymphocytes T auxiliaires : Th1, Th2, Th17, Th22 et Tregs. Chaque sous-type est caractérisé par un profil cytokinique et une fonction distincts. Adapté de (96).

En ce qui concerne la PR, la cytokine clé IL-17 agit sur de nombreuses cellules non-immunitaires tels que les fibroblastes synoviaux, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales et induisent leur sécrétion d'IL-8, GM-CSF, VEGF et des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 (92,97,98). Cela favorise donc le recrutement des PNN vers le site inflammatoire et la néo-angiogenèse. Le rôle pathogénique de l'IL-17 a été en effet mis en évidence par des études qui ont montré que le taux d'IL-17 dans le sérum de patients PR et le nombre de cellules Th17 circulantes corrôlaient positivement avec l'activité de la maladie et le DAS-28 (99). De plus, en utilisant le modèle CIA, Nakae *et al.* ont démontré que les souris déficientes en IL-17 développent une arthrite nettement atténuée par rapport aux souris contrôles suggérant ainsi un rôle important de l'IL-17 dans le développement de l'arthrite dans ce modèle (100). D'une autre part, la production de RANKL par les lymphocytes Th17 est un facteur contributeur à l'ostéoclastogénèse (4).

Les **lymphocytes Treg** CD4<sup>+</sup> sont une sous-population des LT auxiliaires ayant un rôle primordial dans le maintien de la tolérance immunitaire. Il existe différentes sous-populations de lymphocytes Tregs dont les Tregs naturels (nTreg) générés dans le thymus responsables du maintien de l'homéostasie immunitaire et les Tregs induites (iTreg) générés en périphérie ou *in vitro* en présence du TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ) qui sont capables d'inhiber la prolifération et l'expansion des LT (92,101). Elles sont caractérisées par leur expression élevée de CD25, du facteur de transcription Foxp3 (forkhead box p3), de CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) et GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor) à leur surface ainsi que par leur production des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- $\beta$  (102,103). D'autres sous-populations de lymphocytes Treg incluent les lymphocytes Tr1 (type-1 regulatory cells) Foxp3<sup>-</sup> et les lymphocytes Th3 qui exercent leur fonctions suppressives par une sécrétion élevée d'IL-10 et de TGF- $\beta$ , respectivement (104,105).

Au cours de la PR, le nombre de Tregs dans le sang périphérique des patients est réduit par rapport aux sujets sains (106,107). De plus, malgré la détection de lymphocytes Tregs dans les articulations de ces patients, leur activité est détériorée. Cela pourrait être dû à l'influence de l'environnement inflammatoire au niveau de l'articulation (1). En effet, le TNF a été montré comme un modulateur de la capacité régulatrice des Tregs (108). En appui à cette étude,

l'utilisation d'un anti-TNF en clinique induit la fréquence des lymphocytes CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> dans le sang périphérique et rétablit la fonction suppressive de ces cellules (108). Une autre étude a mis en évidence un déficit intrinsèque dans l'inhibition des LT médiée par le CTLA-4 dans les Tregs de patients PR (109) (**Figure 12**).



**Figure 12. L'activation des LT synoviaux dans la PR.** Les lymphocytes Tregs sont présents au niveau des articulations mais leur activité régulatrice n'est pas optimale. En revanche, les LT synoviaux sont activés et différenciés en lymphocytes Th1 et Th17 et jouent leur part dans la sécrétion de cytokines inflammatoires et dans l'induction et l'activation des LB, macrophages et fibroblastes (1).

Les autres sous populations de LT auxiliaires incluent les lymphocytes **Th9** et **Th22** ayant tous les deux un rôle dans le développement de la PR. Les lymphocytes Th9 sécrètent la cytokine IL-9 qui est surexprimée dans les tissus synoviaux rhumatoïdes et qui facilite la survie des PNN et la différenciation des lymphocytes Th17 (110). Les lymphocytes Th22 sont à leur tour présents en grand nombre dans les articulations des patients et promeuvent l'ostéoclastogénèse via leur production d'IL-22 (111). Les lymphocytes **Tfh** (T follicular helper) et **Tph** (T peripheral helper) sont également impliqués dans la physiopathologie de la PR comme montré par Niu *et al.* et Rao *et al.*, respectivement (112,113).

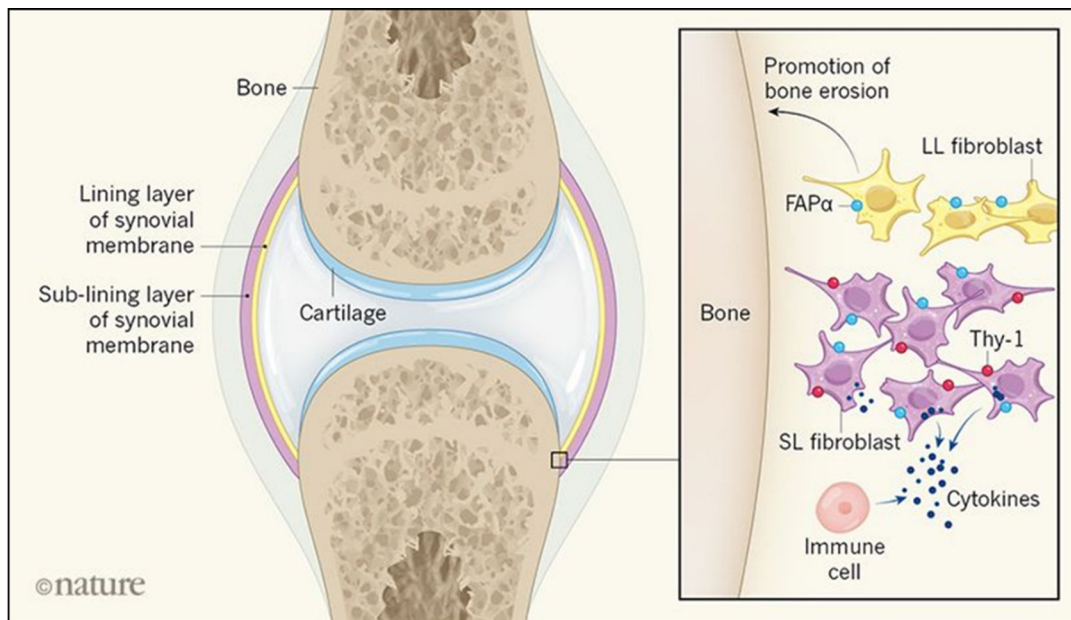
## 2.4. Destruction articulaire

La capsule articulaire comprend la membrane synoviale, l'espace articulaire contenant le liquide synovial (SF), le cartilage et l'os sous-chondral.

### 2.4.1. La membrane synoviale

La membrane synoviale tapisse la face interne de l'articulation et est composée en conditions physiologiques d'uniquement 1 à 4 couches de synoviocytes. Elle constitue une barrière de filtration entre la capsule articulaire et le plasma. Sa fonction est donc de lubrifier et nourrir l'articulation qui est en soi non vascularisé par la synthèse d'acide hyaluronique et de liquide synovial capables d'absorber les chocs mécaniques et de contribuer à la trophicité du cartilage (114,115).

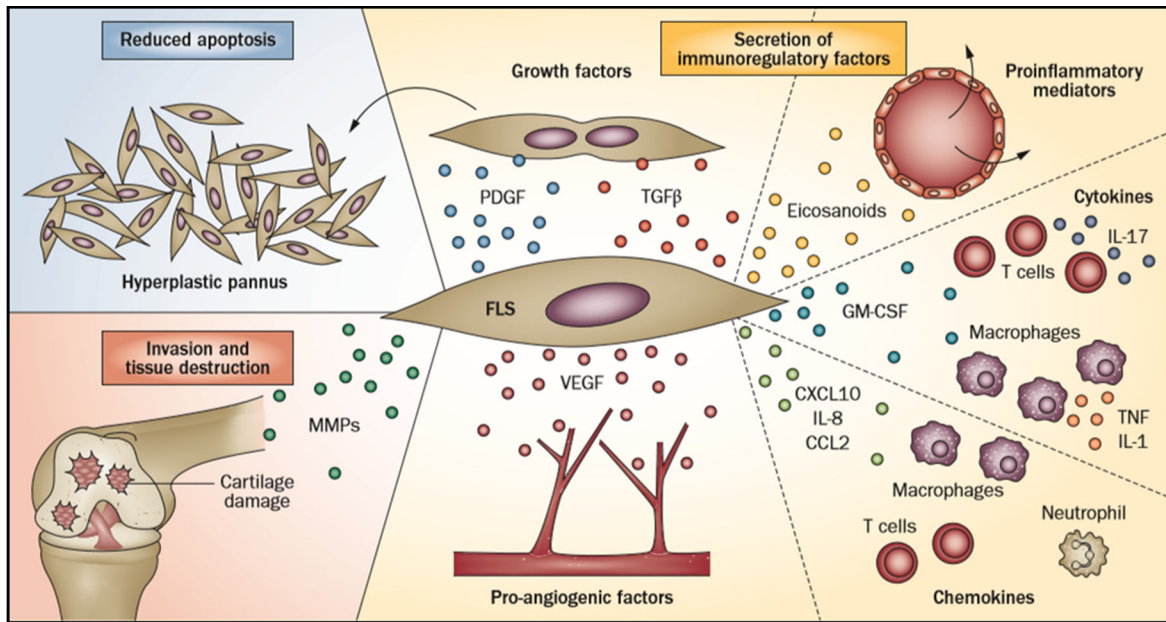
On distingue deux cellules principales : les synoviocytes de type A (macrophagiques) et les synoviocytes de type B (fibroblastiques ou FLS, Fibroblasts-like synoviocytes). Comme préalablement mentionné, tous les deux jouent un rôle dans la physiopathologie de la PR avec un intérêt particulier accordé aux FLS (116). En effet, les FLS adoptent un phénotype invasif conduisant à la formation du pannus devenu ainsi épais d'une douzaine de cellules et à la production de médiateurs solubles pro-inflammatoires et de protéases MMP (117). Une étude par Croft *et al.* a récemment démontré qu'il existe deux sous-populations distinctes de FLS qui provoquent la destruction articulaire et se différencient par leur expression de FAP $\alpha$  (Fibroblast activating protein) et Thy-1 (Thymus cell antigen-1 ou CD90) (**Figure 13**). Les synoviocytes FAP $\alpha$ <sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup> sont localisés au niveau de la couche profonde et sont considérés comme des cellules immunitaires ayant un profil effecteur avec une expression élevée de cytokines et chimiokines. Les synoviocytes FAP $\alpha$ <sup>+</sup>Thy<sup>-</sup> sont localisés d'une autre part dans la couche bordante et sont responsables de la destruction cartilagineuse et osseuse (118).



**Figure 13. Deux sous-populations de synoviocytes contribuent à la destruction articulaire au cours de la PR.** Les FLS  $FAP\alpha^{+}Thy-1^{+}$  sont présents au niveau de la couche profonde et contribuent au processus inflammatoire par la sécrétion de cytokines tandis que les FLS  $FAP\alpha^{+}Thy-1^{-}$  sont localisés au niveau de la couche bordante et sont impliqués dans la destruction cartilagineuse et osseuse (119).

En plus de leur rôle dans la destruction tissulaire, d'autres propriétés sont accordées aux FLS. Elles incluent une apoptose réduite qui conduit à la formation du pannus synovial et une production d'une variété de facteurs de croissance tels que le VEGF qui favorise l'angiogenèse ainsi que des chimiokines et cytokines inflammatoires responsables du recrutement des cellules immunitaires et leur activation (118,120–122) (**Figure 14**).

En outre, plusieurs sous-populations cellulaires ont été récemment identifiées au niveau des articulations arthritiques en utilisant des techniques de scRNA-seq (single-cell RNA sequencing) et cytométrie de masse sur des échantillons de tissus synoviaux. En effet, en se basant sur l'analyse des différents profils de sc-RNAseq et l'expression de clusters de gènes bien définis, des sous-populations distinctes de fibroblastes, monocytes, lymphocytes T et lymphocytes B toutes impliquées dans la physiopathologie de la PR ont été décrites dans une étude par Zhang *et al.* (123).



**Figure 14. Rôle des FLS au cours de la PR.** Les FLS contribuent à la physiopathologie de la PR par une apoptose réduite, une sécrétion de protéases impliquées dans la destruction de la matrice extracellulaire et une production d'une variété de médiateurs solubles (124).

Concernant la membrane synoviale rhumatoïde, des travaux récents par Lewis *et al.* ont permis d'identifier trois différents pathotypes de tissus synoviaux chez les patients atteints de PR à un stade précoce : un pathotype fibroblastique pauci-immune, un pathotype myéloïde riche en macrophages et un pathotype lymphoïde riche en plasmocytes. Ces pathotypes, mis en évidence à l'aide de techniques d'histologie et de RNA-seq (séquençage d'ARN) de biopsies de tissus synoviaux, sont prédictifs de la progression et la sévérité de la PR ainsi que de la réponse aux traitements de fond. En effet, des signatures de gènes associés à un phénotype myéloïde corrént positivement avec une réponse clinique aux traitements contrairement aux gènes associés aux plasmocytes qui, eux, corrént avec une progression plus importante de la PR et une destruction articulaire (125).

#### 2.4.2. Le liquide synovial

Le liquide synovial est un ultrafiltrat du plasma sanguin. Il possède plusieurs fonctions biomécaniques, métaboliques et régulatrices. Sa fonction principale est cependant de réduire la friction en lubrifiant l'articulation et maintenant son homéostasie (116,126).

Il s'agit d'un liquide visqueux et paucicellulaire constitué de plusieurs molécules secrétées par les synoviocytes telles que le HA, les protéoglycanes mais aussi les cytokines et facteurs de croissance qui facilitent la communication entre les cellules (126–128). Au cours de la PR, le SF devient inflammatoire avec une augmentation du nombre de leucocytes (plus que 2000/ml) et une prédominance des PNN. Le liquide devient ainsi moins visqueux à cause de sa teneur réduite en HA mais contient en revanche des concentrations élevées de chimiokines et cytokines inflammatoires (126,129).

Les caractéristiques des différents types de SF sont résumées dans le **tableau 3** ci-dessous.

Caractéristique	Normal	Non-inflammatoire	Inflammatoire- Polyarthrite rhumatoïde
Couleur	Clair	Jaune	Jaune-Opalescent
Transparence	Transparent	Transparent	Transparent ou opaque
Viscosité	Elevée	Elevée	Faible
Leucocytes (/ml)	<200	200-2000	>2000
Pourcentage de PNN	<25	<25	Souvent >50

**Tableau 3. Caractéristiques des différents types de SF. Adapté de (130).**

#### **2.4.2.1. Cellules et cytokines impliquées**

Le rôle des lymphocytes T et monocytes dans la physiopathologie de la PR a été clairement élaboré dans les pages précédentes. Bien que la plupart des études réalisées se focalisent sur celles présentes au niveau de la membrane synoviale, cela ne minimise pas la pathogénicité des PNN et cellules mononucléées du liquide synovial (SFMC). En effet, les PNN secrètent une variété de cytokines inflammatoires qui incluent le TNF, l'IL-6 et l'IL-1 et contribuent à l'environnement hypoxique des articulations atteintes (37). D'une autre part, la fréquence des LT producteurs d'IFN- $\gamma$  et d'IL-17 est plus élevée chez les SFMC que les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). De plus, ces cellules Th17 du SF co-expriment le TNF ou l'IFN- $\gamma$  avec l'IL-17 (131). Pareillement, il existe une sous-population inflammatoire de monocytes intermédiaires CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> dans le SF de patients atteints de PR décrits pour leur production de TNF et IL-1 $\beta$  (132).

Plusieurs cytokines sont donc présentes au niveau du SF; elles proviennent des SFMC mais aussi des FLS, chondrocytes et du plasma sanguin. Ces cytokines pro-inflammatoires sont retrouvées à des concentrations très basses chez les individus sains et deviennent plus concentrées chez les patients avec le développement de la PR. Elles corréleront positivement avec l'activité de la maladie; nous nommons en particulier le TNF, l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-8, l'IL-17, le GM-CSF et l'IL-12 tout en prenant en considération que l'IFN- $\gamma$  reste très peu détectable dans le SF avec les techniques usuelles de dosage protéique (ex. ELISA) (126,128,133). Une importance particulière a été



accordée au TNF et l'IL-6, d'une part à cause de l'effet bénéfique de leur inhibition en clinique et d'autre part de leur implication dans les mécanismes centraux à la pathogenèse de la PR tels que l'activation des leucocytes, des cellules stromales et des chondrocytes, l'induction de la sécrétion de cytokines inflammatoires, l'angiogenèse, et l'ostéoclastogénèse entre autres (134).

Les cytokines anti-inflammatoires retrouvées au sein du SF comprennent à leur tour l'IL-10, le TGF- $\beta$  et les inhibiteurs naturels de cytokines inflammatoires tels que l'IL-1RA (128,133).

Les fonctions et concentrations des principales cytokines du SF rapportées dans la littérature sont détaillées davantage dans le **tableau 4** ci-après.

Cytokine	Fonctions	Concentrations rapportées dans le SF
<b>TNF</b>	Activation des leucocytes , activation des FLS, angiogenèse, induction de RANKL, activation des ostéoclastes, induction de cytokines et MMP, induction des molécules d'adhésion	19,5 ; 170 ; 390 pg/mL
<b>IL-6</b>	Activation des leucocytes, Prolifération et différenciation des lymphocytes, activation des ostéoclastes, réaction de phase aigüe	16 ng/mL ; 5290 U/mL
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Activation des monocytes, activation des chondrocytes et FLS, induction de RANKL, cytokines, MMP et molécules d'adhésion	14,4 ; 116 pg/mL
<b>IL-17</b>	Recrutement de PNN, induction de cytokines, MMP et chimiokines, angiogenèse, activation des FLS, ostéoclastes et chondrocytes	7,5 pg/mL
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Activation des macrophages et lymphocytes, effets immunomodulateurs multiples	0,6 U/mL
<b>IL-10</b>	Induction d'anergie, inhibition de l'activation des leucocytes, inhibition des FLS, inhibition de la sécrétion de cytokines et MMP	24,7 pg/mL

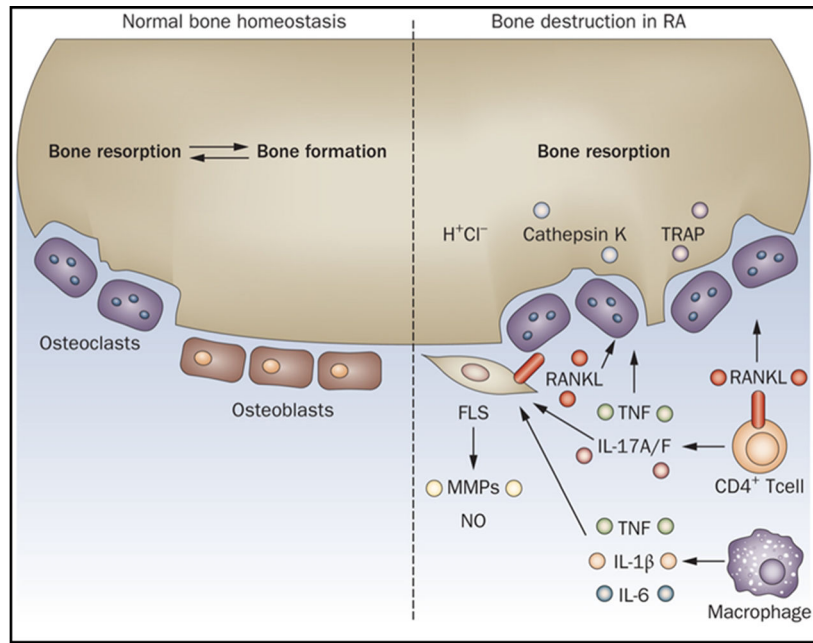
**Tableau 4. Fonctions et concentrations des cytokines du SF. Résumés dans (1,126,133–135)**

Les concentrations des cytokines pro-inflammatoires retrouvées dans le liquide synovial sont donc considérées comme un miroir de l'inflammation ayant lieu au niveau de l'articulation chez les patients atteints de PR. Dans ce contexte, l'effet des SF inflammatoires sur le potentiel immunomodulateur des cellules souches mésenchymateuses a été étudié au cours de mes travaux de thèse et sera détaillé dans les chapitres qui suivent.

### **2.4.3. Destruction cartilagineuse et osseuse**

La formation du pannus synovial est accompagnée d'une dégradation de la matrice cartilagineuse et une résorption osseuse (136).

Dans les conditions physiologiques, l'homéostasie osseuse est assurée par un équilibre entre la formation osseuse due aux ostéoblastes et la résorption due aux ostéoclastes qui sont des cellules multinucléées dérivées de précurseurs myéloïdes (137). Suite aux différents processus inflammatoires, l'équilibre physiologique est perdu en faveur de la résorption osseuse (138). En effet, le pannus synovial favorise l'influx des précurseurs ostéoclastiques et leur différenciation en ostéoclastes matures en présence du M-CSF qui interagit avec son récepteur CSF1-R (colony stimulating factor 1 receptor) à la surface des monocytes et du RANKL qui se lie à son récepteur ostéoclastique RANK et induit une cascade de signalisation par la voie NF- $\kappa$ B (Nuclear factor- $\kappa$ B) (139). Les cytokines inflammatoires TNF, IL-1, IL-6 et IL-17 et les prostaglandines E2 (PGE2) amplifient davantage l'activation et la différenciation des ostéoclastes en induisant l'expression du RANKL qui à son tour stimule la fusion des précurseurs ostéoclastiques (1). Les ostéoclastes deviennent ainsi les acteurs principaux de la destruction osseuse par la sécrétion de protons pour acidifier le compartiment de résorption et par la production de protéases telles que la cathepsine K (137,140) (**Figure 15**). Parallèlement, la formation osseuse est inhibée due à la présence de médiateurs inflammatoires comme par exemple le TNF qui inhibe la différenciation des ostéoblastes (141).



**Figure 15. La résorption osseuse au cours de la PR.** En conditions inflammatoires, l'infiltration des cellules immunitaires dans l'articulation entraîne la production de cytokines inflammatoires telles que le TNF qui induit à son tour la formation d'ostéoclastes par l'induction de RANKL dans la synoviale. Les ostéoclastes, par la sécrétion de protéases, conduisent à la résorption osseuse et la destruction articulaire (137).

Le cartilage articulaire a, de son côté, un potentiel régénératif limité. Les chondrocytes sont responsables du remodelage du cartilage et de l'équilibre entre la formation et la dégradation de la matrice extracellulaire (142). Cependant, sous l'influence des cytokines inflammatoires IL-1β, TNF et IL-17, les chondrocytes deviennent activés et produisent des métalloprotéinases telles que ADAMT5 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) et les MMP responsables de la dégradation des protéoglycanes et collagènes, et donc de la chondrolyse (143–145). Les MMP sont produits de même par les FLS et PNN présents dans l'articulation, ce qui accélère l'apoptose des chondrocytes et la destruction du cartilage (116).

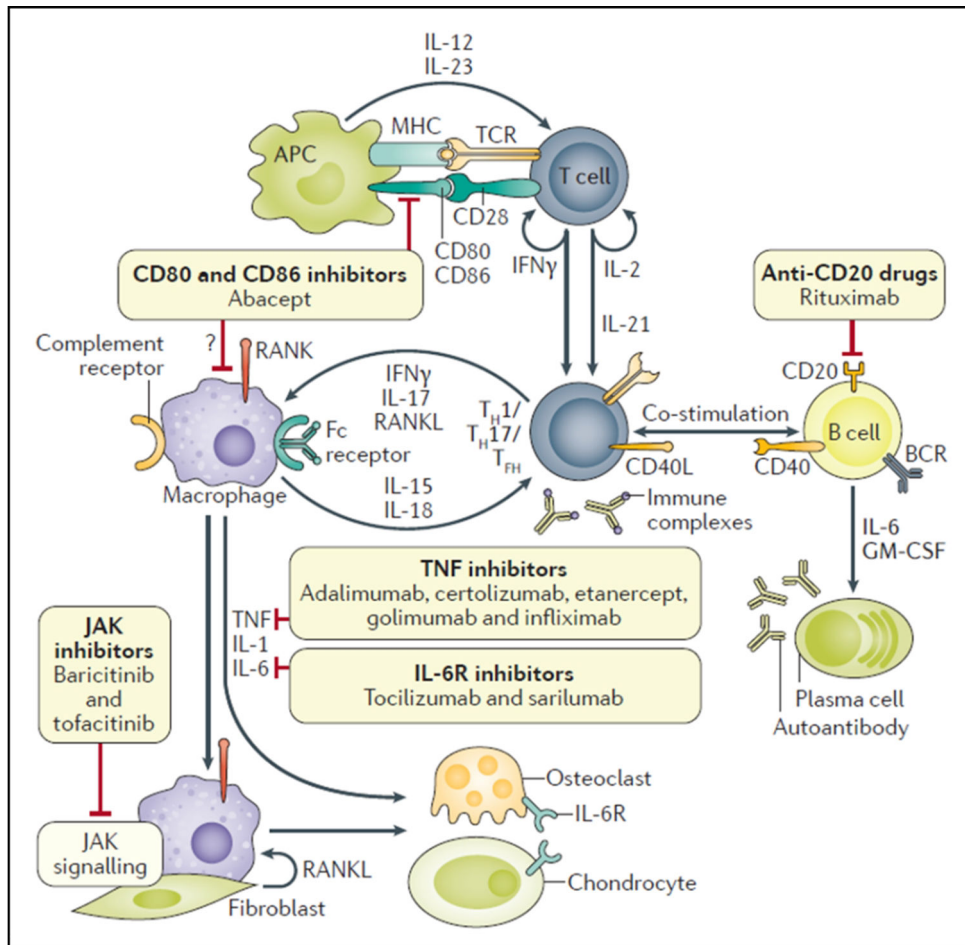
### 3. Thérapies de la polyarthrite rhumatoïde

Avec chaque avancée scientifique sur la physiopathologie de la PR, de nombreuses approches thérapeutiques ont été successivement développées pour sa prise en charge. Nous nommons en particulier les DMARDs (Disease-modifying anti-rheumatic drugs) : les traitements de fond conventionnels, les biothérapies ciblant les cytokines TNF et IL-6, les biothérapies ciblant les LB et LT et les inhibiteurs de JAK (Janus Kinase) (146) **(Figure 16)**. Cependant, malgré leur capacité à contrôler la maladie, qu'il s'agisse des traitements de fond, des biothérapies ou des thérapies cellulaires, il n'existe aujourd'hui aucun traitement curatif.

#### 3.1. Les traitements traditionnels

Avant la découverte des mécanismes impliqués dans la PR, l'approche thérapeutique initiale était la gestion des symptômes par l'utilisation des anti-inflammatoires non-stéroïdiens dont la fonction essentielle est d'inhiber la cyclooxygénase (COX) sans aucun effet sur la progression de la PR (147).

D'autres anti-inflammatoires stéroïdiens telles que les glucocorticoïdes (ex. Prednisolone) sont utilisés pour des périodes limitées dans le temps à cause de leurs effets secondaires à long terme (148). Selon les recommandations de l'EULAR, il est conseillé d'initier le traitement avec des **DMARDs synthétiques conventionnels**, généralement le méthotrexate qui est un agent antimétabolite, en combinaison avec des glucocorticoïdes à court terme. D'autres DMARDs conventionnels incluent la sulfasalazine, le léflunomide et l'hydroxychloroquine qui sont tous plutôt utilisés en seconde ligne (149).



**Figure 16. Les DMARDs utilisés dans la prise en charge de la PR.** Les inhibiteurs de TNF, d'IL-6R, les inhibiteurs de JAK ainsi que les biothérapies ciblant les LB et les LT ont tous pour but d'inhiber l'action des cytokines inflammatoires impliquées dans l'initiation et la progression de la PR (27).

### 3.2. Les biothérapies

L'utilisation des biothérapies en clinique a révolutionné la prise en charge des patients atteints de PR en limitant son évolution. Compte tenu de l'implication des différents cytokines et cellules immunitaires dans la physiopathologie de la PR, nous distinguons les DMARDs biologiques (bDMARDs) ciblant les cytokines et ceux ciblant les cellules.

### 3.2.1. Biothérapies ciblant les cytokines inflammatoires

Une des stratégies immunomodulatrices importante dans la prise en charge de la PR est la neutralisation des fonctions des cytokines inflammatoires. Celles qui ont montré le plus d'efficacité thérapeutique est la neutralisation du TNF et la neutralisation du récepteur de l'IL-6 (IL-6R) (134).

Les **anti-TNF** peuvent se présenter sous formes d'anticorps monoclonaux, tels que l'infliximab (anticorps chimérique de type IgG1), l'adalimumab et le golimumab (anticorps humains de type IgG1), le certolizumab (fragment Fab pégylé d'un anticorps humains) ou sous forme d'un récepteur soluble du TNF (TNF-RII) tels que l'éta nercept qui reconnaît également la lymphotoxine- $\alpha$  (150–154).

Outre leur effet direct sur l'inflammation et les paramètres biologiques des patients, les inhibiteurs du TNF en combinaison avec le méthotrexate induisent l'activité des Tregs, polarisent les macrophages vers un phénotype alternatif en induisant les marqueurs CD16, CD163 et MerTK et inhibant les marqueurs pro-inflammatoires CD40 et CD80 et les cytokines TNF, IL-6 et IL12 et finalement, limitent la destruction articulaire (155,156). Les anti-TNF ont également un effet sur différents processus biologiques qui mériteraient des études plus approfondies tels que l'angiogenèse, l'expression de cytokines et chimiokines et l'homéostasie osseuse (155,157,158). Cependant, malgré l'efficacité des anti-TNF en clinique, ces derniers sont associés à certains effets indésirables dont l'augmentation du risque d'infections bactériennes telles que la tuberculose (159).

L'**inhibition de l'IL-6** chez les patients atteints de PR est possible grâce à la neutralisation de son récepteur par le tocilizumab (anticorps monoclonal humains anti-IL6R). L'anti-IL6R a montré une amélioration des signes cliniques et biologiques chez les patients tout en réduisant la différenciation des LT en cellules Th17 et induisant l'activité des Tregs (160). Il a également fait preuve d'une inhibition de la destruction articulaire (161). Cependant, comme les anti-TNF, il est associé à un risque peu élevé d'infections bactériennes et aussi à une augmentation des paramètres lipidiques et une neutropénie (162–164).

L'**inhibition de l'IL-1** par l'anakinra, protéine recombinante de l'IL-1RA, a montré à son tour une efficacité en clinique qui reste limitée par rapport aux autres biothérapies disponibles, notamment les anti-TNF (165).

D'autres biothérapies ont montré une efficacité plus modeste telles que les biothérapies ciblant l'IL-12/IL-23 (ustekinumab), l'IL-17 (secukinumab) et le GM-CSF (mavrilimumab), entre autres (1).

### **3.2.2. Biothérapies ciblant les cellules**

La neutralisation des cellules impliqués dans la physiopathologie de la PR, plus précisément les LT et LB, est une autre stratégie immunomodulatrice importante dans la prise en charge de la PR surtout chez les patients en échec de thérapies anti-TNF.

Le **CTLA4-Ig** ou abatacept est une protéine de fusion avec un fragment Fc d'IgG1 humaine qui inhibe la voie de co-stimulation entre les APC et les LT. Il se lie aux récepteurs CD80/CD86 à la surface des LT inhibant ainsi leur activation et leur fonction effectrice (166). Il a montré une efficacité importante en clinique en limitant la destruction articulaire et la différenciation des ostéoclastes (167). D'autres mécanismes d'action proposés incluent l'inhibition de la migration des macrophages, de l'expression de cytokines et de l'infiltration cellulaire dans la synoviale (168). L'administration de doses élevées de CTLA4-Ig pourrait faiblement augmenter le risque infectieux chez les patients (169).

L'**anti-CD20** ou rituximab est un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre le CD20 à la surface des LB, provoquant ainsi la déplétion des LB périphériques principalement par apoptose des cellules. Il réduit le titre d'auto-anticorps et est donc plus efficace chez les patients séropositifs (ACPA, RF) (170). Son administration chez les patients limite la progression de la PR et améliore les signes cliniques et biologiques et il reste également peu associé à des risques infectieux (169,171).

### 3.3. Les DMARDs synthétiques ciblés

Les cytokines inflammatoires, y compris l'IL-6, le GM-CSF et les interférons, signalisent par la voie JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) d'où l'intérêt thérapeutique de développer des **inhibiteurs de JAK** afin de bloquer cette voie de signalisation. En effet, les inhibiteurs de JAK empêchent la transduction du signal par ces cytokines et ont déjà montré une efficacité clinique importante dans la PR. Nous nommons en particulier le tofacitinib (inhibiteur de JAK1/3) et le baricitinib (inhibiteur de JAK1/2) (172,173). Le tofacitinib inhibe la prolifération des LT et FLS chez les patients atteints de PR et diminue la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL-17 (174).

D'autres DMARDs développés avec un succès plus limité ou en cours de développement incluent les DMARDs ciblant les voies de signalisation Syk (Spleen Tyrosine Kinase), MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) et NF-κB (175–178).

Il est important de noter qu'il existe également de nombreuses autres cibles ayant un potentiel important dans la thérapie de la PR comme par exemple les miRNA qui contribuent à la physiopathologie de la PR, les TLR et les histones désacétylases (45).

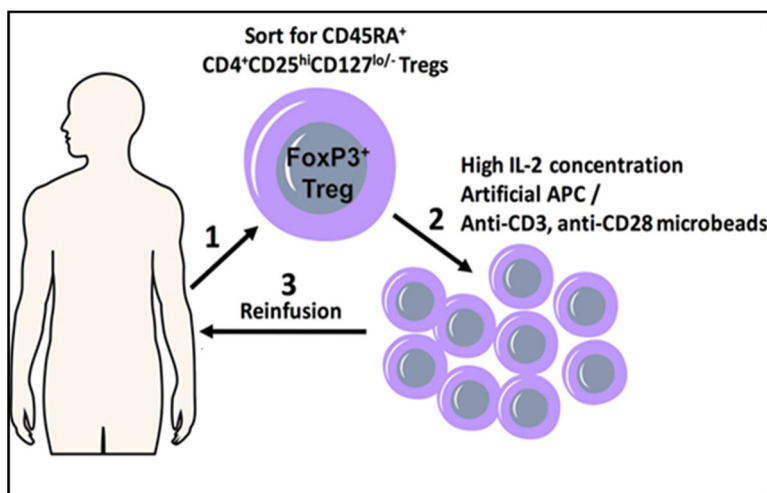
### 3.4. La thérapie cellulaire

Comme déjà démontré dans les pages précédentes, les patients atteints de PR présentent des profils cliniques différents et répondent bien entendu différemment aux traitements disponibles. Pour cela, de nouvelles stratégies de thérapie cellulaire voient actuellement le jour afin de restaurer la tolérance immunitaire à long terme chez les patients.

Le **transfert adoptif de lymphocytes Tregs** spécifiques d'antigènes en est un exemple important. En effet, cette approche consiste d'isoler les cellules Tregs et les expandre *ex vivo* avant de les transférer chez les patients avec ou sans modification génétique (179) (**Figure 17**). Plusieurs groupes ont montré un effet positif du transfert adoptif des Tregs sur la progression de l'arthrite



dans le modèle CIA et une réduction des lymphocytes Th17 au niveau des ganglions lymphatiques (180,181). Un grand défi de l'utilisation de cette stratégie est cependant le maintien de la stabilité des Tregs *in vivo* après infusion.



**Figure 17. Le transfert adoptif de Tregs pour induire la tolérance immunitaire.** (1) Les Tregs sont isolés du patient et (2) sont ensuite expansés *ex vivo* en présence d'IL-2 ou d'APC ou de billes anti-CD3/anti-CD28 avant d'être (3) re-infusés chez le patient. Adapté de (179).

Une autre approche prometteuse pour induire la tolérance immunitaire est l'utilisation des **cellules dendritique tolérogènes (tolDC)**. En effet, le traitement des DC dérivées de monocytes par des agents immunosuppresseurs induit leur capacité immunorégulatrice par la sécrétion du TGF- $\beta$  et l'inhibition des LT CD4<sup>+</sup> (182). Cela a été vérifié d'une part dans le modèle CIA où les injections de DC immatures ont montré une amélioration de l'arthrite par l'induction de lymphocytes Tregs CD49b<sup>+</sup> *in vivo* ayant de hautes capacités immunosuppressives (183). D'une autre part, des essais cliniques Phase I évaluant l'effet des injections de tolDC chez des patients atteints de PR ont conduit à des résultats cliniques prometteurs avec une production réduite de cytokines inflammatoires et une réduction des fonctions effectrices des LT (184).

Malgré les thérapies remarquables déjà utilisées dans la prise en charge de la PR, la complexité des différents processus biologiques qui rentrent en jeu dans sa pathogénèse ainsi

que la nécessité de cibler simultanément l'immunité innée et adaptative empêchent la mise en place d'un traitement curatif définitif. La découverte des **cellules souches mésenchymateuses** a donc permis le développement d'une piste innovante dans le traitement de la PR par leur double capacité régénérative et immunomodulatrice.

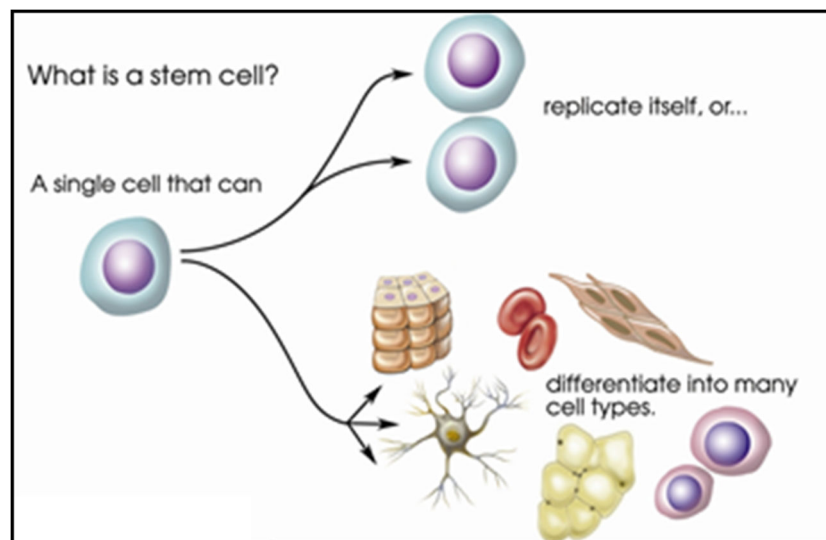
## Chapitre 2. Les cellules souches mésenchymateuses

Avant d'aborder le potentiel thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses, il serait critique d'introduire en premier lieu le concept général des cellules souches ainsi que les différents types de cellules existantes.

### 1. Généralités sur les cellules souches

Le concept de cellules souches a été évoqué pour la première fois à la fin du 19<sup>e</sup> siècle par le scientifique allemand Ernst Haeckel, pour décrire d'une part « l'ancêtre unicellulaire de tous les organismes multicellulaires » et d'autre part, « l'œuf fécondé qui donne naissance à toutes les cellules de l'organisme » (185).

En effet, les cellules souches sont par définition des cellules non-différenciées. Elles sont capables de s'auto-renouveler indéfiniment et de se différencier en différents types cellulaires (**Figure 18**).



**Figure 18. Les propriétés des cellules souches.** (D'après la brochure issue des Académies Nationales des Sciences, Ingénierie et Médecine, *Understanding Stem Cells : An Overview of the Science and the Issues*, 2006)

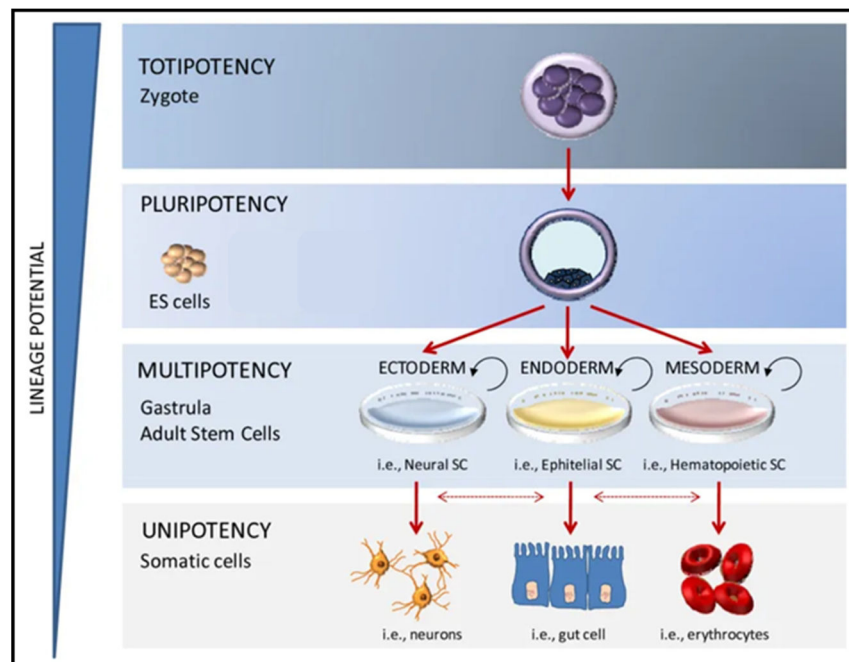
Selon leur potentiel de différenciation et leur origine, nous distinguons différentes classes de cellules souches (**Figure 19**):

- Les **cellules souches totipotentes** correspondent aux stades allant du zygote (œuf fécondé) au morula (8 cellules). Elles sont capables de se différencier en tout type cellulaire dont les annexes placentaires et peuvent donc donner naissance à un organisme entier (186).
- Les **cellules souches pluripotentes** composent la masse cellulaire interne du blastocyte. Elles se différencient en tous les types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) y compris les annexes placentaires, mais ne peuvent donner naissance à un organisme entier. Elles incluent les cellules souches embryonnaires (d'où surviennent les problèmes éthiques de l'utilisation clinique de ces cellules, puisque leur isolement nécessiterait la destruction de l'embryon) et les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) (187,188).
- Les **cellules souches multipotentes** peuvent se différencier en des cellules issues de leur même feuillet embryonnaire (endodermique, mésodermique ou ectodermique). Elles ont une capacité proliférative plus limitée que les cellules pluripotentes et sont catégorisées en cellules fœtales ou cellules adultes. Les cellules adultes sont responsables de la réparation ou la régénération des tissus lésés; nous nommons comme exemple les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches mésenchymateuses (189,190).
- Les **cellules souches unipotentes** sont capables de se différencier en seul type cellulaire tout en maintenant leur capacité d'auto-renouvellement. Elles sont responsables de l'homéostasie tissulaire comme par exemple les cellules de l'épiderme, du muscle et du foie (191).

## 2. Les cellules souches mésenchymateuses

### 2.1. Histoire

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) ont été décrites pour la première fois durant les années 1960 et 1970 par Friedenstein *et al.* qui ont d'abord montré que la transplantation de moelle osseuse sous la capsule rénale de souris aboutit à la formation d'os suggérant ainsi l'existence d'une population de cellules souches non-hématopoïétiques capables de se différencier en ostéoblastes. Parallèlement, ils ont démontré *in vitro* que l'ensemencement à faible densité de cellules de la moelle permet la formation de colonies adhérentes au plastique ayant une morphologie fibroblastique qu'ils ont dénommés CFU-F (colony forming units-fibroblast). Il a été plus tard démontré que ces mêmes cellules sont capables de se différencier *in vitro* en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes (192,193). Ce n'est cependant qu'en 1991 qu'Arnold Caplan leur confère le terme « cellules souches mésenchymateuses » (194).



**Figure 19. Les différentes classes des cellules souches.** Les cellules souches sont classées selon leur origine et potentiel de différenciation en cellules souches totipotentes, pluripotentes, multipotentes et unipotentes. Adapté de (195).

Bien que ce terme soit utilisé dans ce manuscrit pour désigner la population hétérogène de MSC, il est important de noter que cette nomenclature reste un sujet de débat dans la communauté scientifique puisqu'elle est considérée comme un terme trop global. En effet, les MSC peuvent être isolées de différents tissus et leurs propriétés ainsi que leur potentiel de différenciation *in vivo* ne sont pas complètement identiques mais plutôt spécifiques du tissu en question.

Pour mon manuscrit, je désignerai comme « MSC » les cellules souches issues des différents tissus ayant des propriétés semblables à l'exception des MSC dérivées du tissu adipeux qui font l'objet de mon travail de thèse et que je désignerai comme « ADSC ».

## 2.2. Définition

En 2006, et afin de réduire les inconsistances dans les différentes méthodes d'isolement et d'expansion de MSC utilisées, la société internationale de thérapie cellulaire (ISCT) a proposé des critères minimaux bien définis pour pouvoir considérer les cellules isolées d'un organe ou tissu comme des cellules stromales mésenchymateuses multipotentes (196). Ces critères dictent que les cellules soient :

- Capables d'adhérer au plastique dans les conditions standards de culture,
- Positives pour les marqueurs non-hématopoïétiques CD105, CD73 et CD90 et négatives pour les marqueurs hématopoïétiques CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79α ou CD19 et HLA classe II,
- Capables de se différencier en chondrocytes, ostéoblastes et adipocytes dans les conditions de différenciation standards *in vitro*.

En plus des critères établis par l'ISCT, les MSC expriment d'autres marqueurs extracellulaires détaillés davantage dans le **tableau 5** ci-dessous.

<b>Récepteurs aux facteurs de croissance</b>	EGFR, bFGFR, IGFR, PDGFR, TGFβR
<b>Récepteurs aux chimiokines</b>	CCR1, CCR2, CCR4, CCR6, CCR7, CCR9, CCR10 CXCR1, CXCR2, CXCR4, CXCR5, CXCR6 and CX3CR1
<b>Récepteurs aux cytokines</b>	IL-1R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, IFNγR and TNFI et IIR
<b>Récepteurs d'adhésion cellulaire</b>	Intégrines, CD44, ICAM-1,-2, VCAM-1
<b>Autres récepteurs immunomodulateurs</b>	TLRs 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 9, PDL-1 Négatives pour CD40, CD80, CD86,

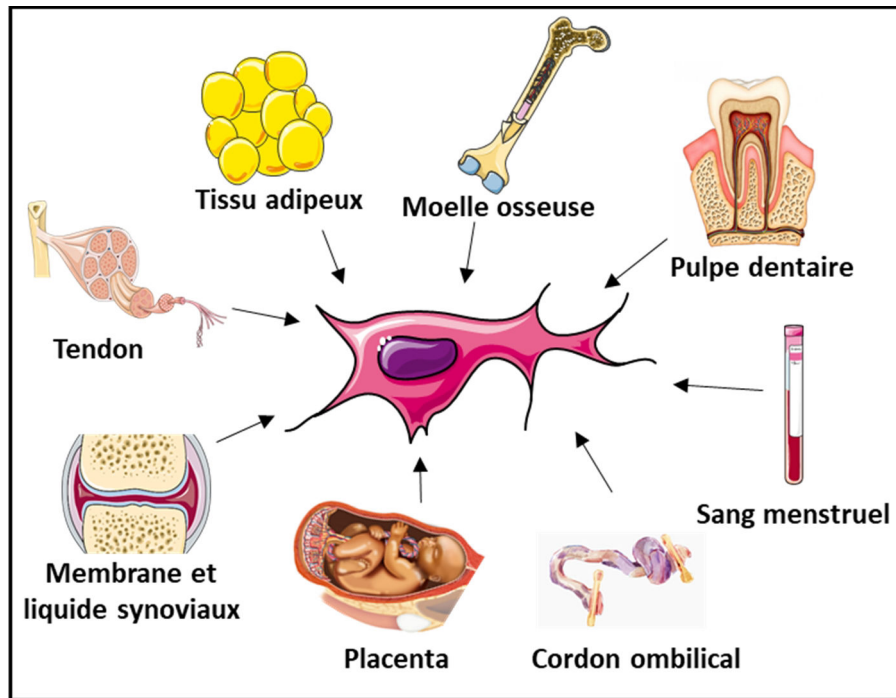
**Tableau 5. Marqueurs extracellulaires des MSC.** Résumé de (197).

De plus, outre la capacité des MSC de se différencier en chondrocytes, ostéoblastes et adipocytes, de nombreuses études ont démontré leur capacité de se différencier dans les conditions appropriées en des cellules squelettiques musculaires, cardiomyocytes et ténocytes, entre autres (198–200).

### 2.3. Sources

Les MSC sont retrouvées dans le stroma de tous les organes (201). Les premières MSC décrites étaient initialement isolées de la moelle osseuse. Cependant, depuis, les MSC ont été isolées avec succès de nombreux autres organes et tissus tels que le tissu adipeux, le sang du cordon ombilical, le placenta, la membrane synoviale, le liquide synovial, le tendon, la pulpe dentaire et le sang menstruel (202–208) (**Figure 20**).

Le tissu adipeux représente une source de cellules prometteuse alternative à la moelle osseuse. En effet, les cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (ADSC) ont des propriétés comparables à celles dérivées de la moelle osseuse (BMSC) avec l'avantage d'être plus facilement isolées par des techniques moins invasives (liposuction ou abdominoplastie), en quantités plus abondantes et avec une capacité proliférative importante. De plus, malgré les études limitées comparant directement les deux sources de cellules, il est suggéré que les ADSC possèdent un potentiel immunosuppresseur supérieur au BMSC en raison d'une expression plus élevée de médiateurs anti-inflammatoires (209,210). Pour cela, mes travaux de thèse se sont focalisés sur l'utilisation des ADSC en tant que modèle de thérapie cellulaire.

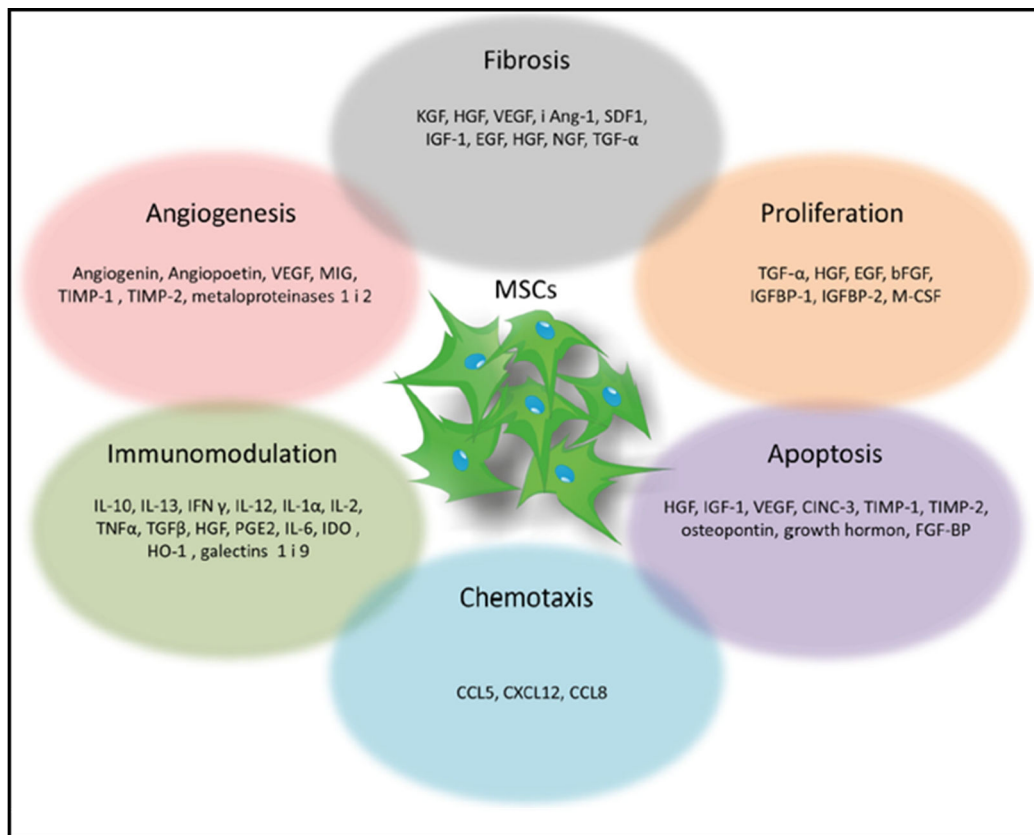


**Figure 20. Les sources des MSC.** Les MSC sont isolées de nombreux organes et tissus tels que la moelle osseuse, le tissu adipeux, le tendon, la membrane et liquide synoviaux, le placenta, le sang menstruel et la pulpe dentaire.

## 2.4. Propriétés

Bien que les MSC soient singularisées pour leur caractère multipotent décrit dans les parties précédentes, il devient de plus en plus clair que l'intérêt clinique principal de leur utilisation en thérapie cellulaire provient de l'éventail de fonctions trophiques offertes par leur sécrétome (211). En effet, en cas d'inflammation, les MSC sont mobilisées et recrutées au site concerné par chimiotactisme. L'environnement inflammatoire stimule par la suite les MSC à sécréter des facteurs paracrines qui jouent collectivement un rôle dans le soutien du processus régénératif et le contrôle de l'inflammation au niveau des tissus lésés (212). Ce rôle anti-fibrotique, anti-apoptotique, pro-angiogénique et immunomodulateur sera détaillé davantage dans les pages qui suivent (**Figure 21**).





**Figure 21. Les mécanismes impliqués dans le rôle trophique des MSC.** Le sécrétome des MSC présente un éventail de fonctions anti-fibrotiques, anti-prolifératives, anti-apoptotiques, pro-angiogéniques et immunomodulatrices (213).

#### 2.4.1. Rôle anti-fibrotique

La fibrose, caractérisée par une accumulation anormale des constituants de la matrice extracellulaire, est un élément prédominant de nombreuses maladies inflammatoires chroniques, en particulier celles touchant les poumons, cœur, foie et reins (214). Les facteurs de croissance tels que HGF (hepatocyte growth factor), FGF-2 et VEGF secrétées par les MSC ont fait preuve d'une activité anti-fibrotique dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* (215). En effet, une étude conduite par Dong *et al.* a montré que l'infusion d'ADSC humaines empêche l'activation de fibroblastes et le dépôt de collagènes dans un modèle murin de fibrose pulmonaire en induisant l'expression de HGF tissulaire ainsi que la diminution de l'expression de TGF- $\beta$ 1 qui est à son tour un acteur pro-fibrotique (216). Une autre étude par Ohnishi *et al.* a démontré l'effet des milieux conditionnés issus de culture de MSC sur l'inhibition de la prolifération et la

synthèse de collagènes de type I et III par des fibroblastes cardiaques *in vitro* mettant ainsi en évidence l'effet paracrine des MSC (217).

#### **2.4.2. Rôle anti-apoptotique**

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est une conséquence directe des processus inflammatoires ayant lieu au cours de certaines pathologies. Dans ce cas aussi, les MSC sont capables de limiter l'apoptose, protéger les cellules résidentes et induire leurs fonctions par la sécrétion de molécules paracrines telles que l'IGF (insulin-like growth factor), HGF, VEGF, inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases matricielles (TIMP) et stanniocalcine-1 (STC-1) (218–220). En effet, les MSC diminuent l'apoptose de fibroblastes irradiés par des rayons ultraviolets (UV) dans un système de co-culture *in vitro* et ce, par la sécrétion de STC-1 puisque la neutralisation de cette molécule réduit l'effet observé (220). *In vivo*, l'injection de MSC dans un modèle murin d'infarctus de myocarde empêche l'apoptose des cardiomyocytes par l'inhibition de caspase-3 qui est une enzyme pro-apoptotique et induit des effets cardioprotecteurs en réduisant la taille de l'infarctus et améliorant la fonction cardiaque (221).

#### **2.4.3. Rôle pro-angiogénique**

Les MSC stimulent l'angiogenèse et la vasculogenèse par la sécrétion de nombreux facteurs bioactifs tels que le VEGF, bFGF (basic-fibroblast growth factor), MCP-1 et angiogénine (222,223). Ces facteurs régulent la prolifération des cellules endothéliales tout en réduisant leur perméabilité. Leur rôle pro-angiogénique a été démontré dans un modèle murin d'ischémie des membres postérieurs où la transplantation de MSC améliore la perfusion sanguine et la densité capillaire chez les rats jusqu'à 3 semaines après injection par une sécrétion élevée de VEGF et bFGF (224). Cet effet a été également vérifié *in vitro* où les milieux conditionnés issus de cultures d'ADSC humaines (ADSC-CM) en conditions hypoxiques (1% O<sub>2</sub>) augmentent la croissance des cellules endothéliales et inhibe partiellement leur apoptose (225). Une autre étude par Ishikane

*et al.* a montré que la transplantation de MSC induit une néovascularisation dans un modèle d'infarctus de myocarde (226).

#### 2.4.4. Autres rôles trophiques

Une des propriétés importante des MSC est leur **capacité de « homing »** ou migration vers le site d'inflammation. Nous avons vu précédemment que les MSC expriment à leur surface des récepteurs aux chimiokines et des intégrines qui leur permettent d'infiltrer le site endommagé. Une fois infiltrées, et toujours par leur sécrétome, les MSC mobilisent et stimulent les cellules souches résidentes à se différencier et contribuent indirectement à la régénération tissulaire (227,228).

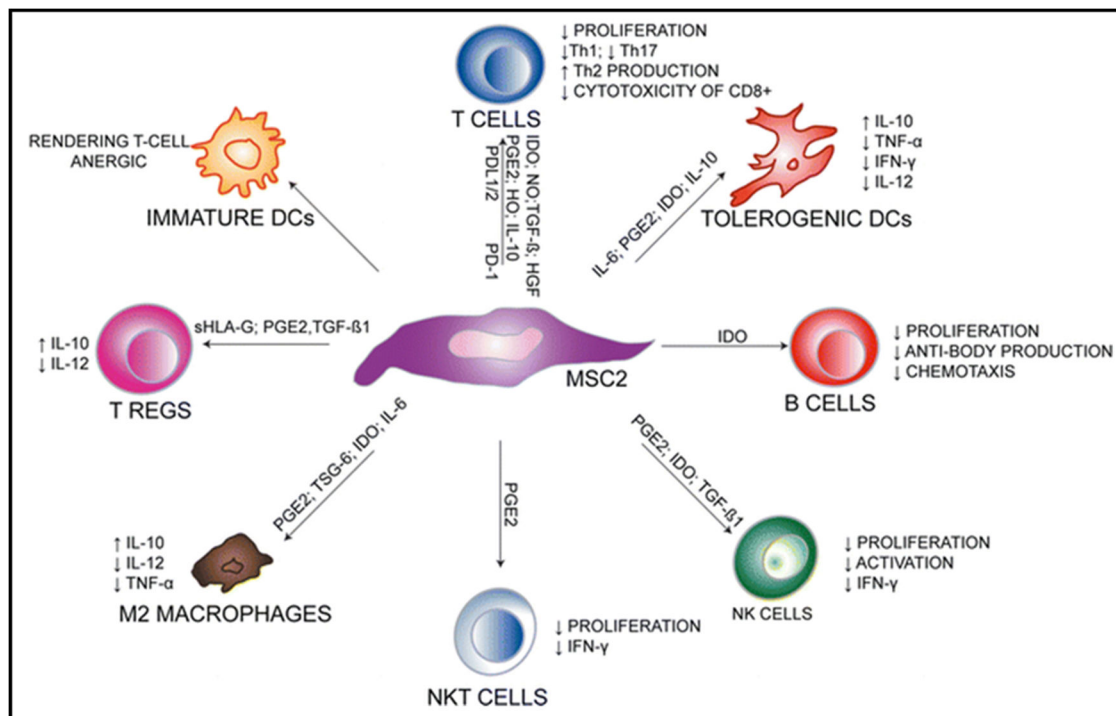
D'autres rôles des MSC incluent une **activité antioxydante** (comme démontré par les ADSC-CM qui protègent les fibroblastes dermiques contre le stress oxydatif et inhibent leur apoptose) et une **activité antibactérienne** (229). En effet, suite à un stimulus microbien, les MSC secrètent des peptides antimicrobiens comme la cathélicidine LL-37 et la  $\beta$ -défensine 2 qui agissent contre différentes bactéries telles que *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (230,231).

Bien que les MSC exercent de nombreux effets thérapeutiques intéressants, la propriété la plus attirante pour leur utilisation dans le traitement des maladies auto-immunes est leur **potentiel immunomodulateur**.

## 2.5. Potentiel immunomodulateur

L'intérêt majeur de l'utilisation des MSC en tant qu'outil thérapeutique est leur faible immunogénicité. En effet, les MSC sont immuno-évasives étant donné qu'elles expriment faiblement le MHC-I à leur surface et n'expriment ni le MHC-II ni les molécules de co-stimulation CD40, CD80 et CD86 (196,232). De plus, comme décrit précédemment, elles sont facilement cultivées *ex vivo* et possèdent des propriétés immunosuppressives et immunomodulatrices par

deux mécanismes d'action bien distinctes : le contact cellulaire et la sécrétion de médiateurs solubles (212). Ainsi, les MSC inhibent la prolifération et la fonction effectrice des acteurs majeurs impliqués dans la physiopathologie des maladies auto-immunes dont la PR. Nous nommons en particulier les lymphocytes T, macrophages, lymphocytes B, cellules dendritiques, polynucléaires neutrophiles et cellules NK (233) (**Figure 22**).



**Figure 22. Les propriétés immunomodulatrices des MSC.** Les MSC modulent la prolifération et les fonctions effectrices des cellules immunitaires soit par contact cellulaire (PD-L1) soit par la production de médiateurs solubles (IDO, PGE2, IL-6, TSG-6, IL10, TGF-β, sHLA-G) (233). IDO: indoleamine-1,2-dioxygenase, TSG-6: tumor-necrosis factor stimulated gene-6, sHLA-G: soluble leukocyte antigen-G.

Les MSC ne sont pas constitutivement immunomodulatrices mais le deviennent après stimulation par un environnement inflammatoire, plus précisément par les cytokines IFN-γ en présence du TNF ou l'IL-1β ou même par le TNF seul (234–236). A la suite de cette activation, les MSC secrètent des chimiokines telles que **MCP-1**, **CCL5** ou **RANTES** (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted), **CXCL5**, et **IL-8** et augmentent leur expression des molécules d'adhésion **ICAM-1** (intercellular adhesion molecule 1), **VCAM-1** (vascular cell adhesion molecule 1) et des **intégrines** aboutissant au recrutement et à leur interaction avec les

cellules immunitaires (197,234,237–239). Ces interactions résultent en l'inhibition des cellules pro-inflammatoires soit par transmission d'un signal co-inhibiteur par le **PD-L1** (programmed death-ligand 1) pour les LT soit par la production de médiateurs solubles tels que l'indoleamine-1,2-dioxygénase (**IDO**), la **PGE2**, l'**IL-6**, l'**IL-10**, le **TGF- $\beta$** , le **HGF** et le tumor-necrosis factor stimulated gene-6 (**TSG-6**) (212,240,241). Le mécanisme d'action de ces médiateurs sera détaillé davantage dans les pages qui suivent dans le cadre des interactions des MSC avec les différentes cellules immunitaires.

### **2.5.1. Interactions avec les cellules immunitaires**

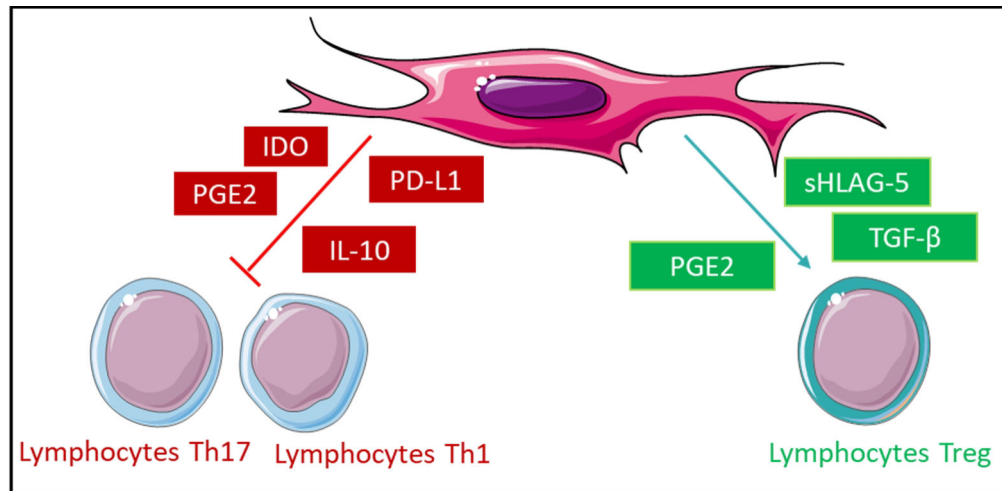
#### **2.5.1.1. Interactions avec les lymphocytes T**

Les LT jouent un rôle central dans l'immunité adaptative. Il n'est donc pas surprenant que la plus grande majorité des études concernant le potentiel immunomodulateur des MSC se concentrent sur les LT. En effet, il a déjà été montré que les MSC, y compris les ADSC, inhibent la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> activés *in vitro* par des mitogènes ou par des anticorps anti-CD3/anti-CD28 en arrêtant le cycle cellulaire à la phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (242–245). Cette inhibition passe partiellement par la sécrétion des facteurs solubles IDO et PGE2. L'IDO est une enzyme qui catalyse la dégradation du tryptophane en kynurénine. Cela résulte en la déplétion du tryptophane dans le milieu, qui est un acide aminé essentiel à la prolifération des cellules, et en l'accumulation de produits toxiques (4). La PGE2, produit du métabolisme de l'acide arachidonique par l'enzyme cyclooxygénase-2 (COX-2), est à son tour un immunosuppresseur des LT par inhibition de la mitose cellulaire (246). Une étude par Rozenberg *et al.* a montré que la neutralisation sélective de PGE2 dans les milieux conditionnés issus de culture de MSC inhibe le potentiel immunosuppresseur de ces dernières (247). Le rôle de PGE2 a également été montré par Bouffi *et al.*, où les MSC déficientes en IL-6 ne sé/crétant pas de la PGE2 sont incapables de contrôler l'arthrite quand injectées dans un modèle CIA (248). De plus, par leur expression d'ICAM-1 et VCAM-1, les MSC interagissent directement avec LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) et VLA-4 (very late antigen-4) exprimés à la surface des lymphocytes et transmettent un signal co-inhibiteur par l'interaction du complexe programmed cell death

protein-1 (PD-1)/PD-L1 (239,249). Par contraste aux MSC humaines qui utilisent l'IDO comme acteur principal, il a été montré que la suppression de la prolifération des LT par les MSC murines est due principalement à la production de iNOS (inducible-nitric oxyde) qui produit l'oxyde nitrique (NO) (234). De plus, dû à leur propriété immuno-évasive, les MSC d'origine humaine ont été montrées efficaces dans le traitement de nombreux modèles animaux suggérant ainsi une non-spécificité d'espèce dans leur potentiel immunomodulateur (250,251).

En ce qui concerne la différenciation des sous-types de LT auxiliaires à partir de cellules T, les MSC inhibent la génération de lymphocytes Th1 et Th17 et leurs sécrétions des cytokines pro-inflammatoires IFN- $\gamma$ , TNF et IL-17 (252,253). Cela est accompagné par une inhibition des facteurs de transcriptions T-bet (T-box expressed in T cells) et ROR- $\gamma$ t (retionoid acid-related orphan receptor gamma t) responsables de la différenciation des lymphocytes Th1 et Th17 respectivement par des mécanismes PGE2 et PD-L1-dépendants (247,254,255) (**Figure 23**). De plus, l'équilibre des cellules Th1/Th2 en culture *in vitro* en présence des MSC tend vers le phénotype anti-inflammatoire Th2 avec une sécrétion élevée d'IL-4 (256).

Un des effets les plus importantes des MSC est leur restauration de la tolérance immunitaire par la génération des lymphocytes Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> *in vitro* et *in vivo* ayant des propriétés fonctionnelles immunosuppressives (244,257). En effet, l'expansion des Tregs en présence des MSC est possible par la sécrétion de sHLA-G (soluble human leukocyte antigen 5), TGF- $\beta$  et PGE-2 étant donné que l'inhibition d'un ou plusieurs de ces molécules résulte en la diminution du pourcentage de Tregs générés en culture (257,258) (**Figure 23**).



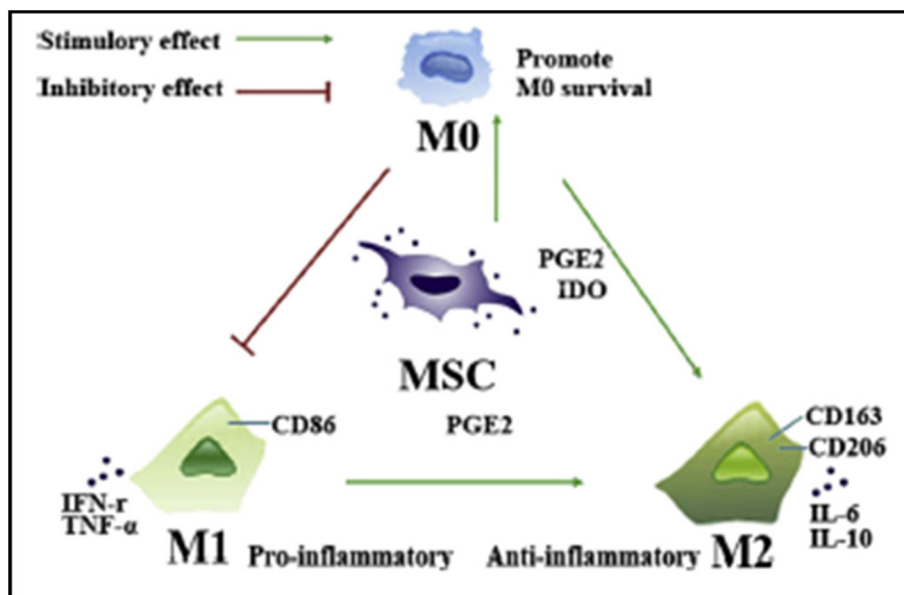
**Figure 23. Les interactions des MSC avec les LT.** Les MSC inhibent la différenciation des lymphocytes Th1 et Th17 par l'expression de PGE2, IDO, IL-10 et PD-L1 et induisent des Tregs par la production de PGE2, sHLA-5 et TGF-β.

#### 2.5.1.2. Interactions avec les lymphocytes B

Les LB matures, ou plasmocytes produisent les auto-anticorps impliqués dans la physiopathologie des maladies auto- immunes et se comportent comme des cellules présentatrices d'antigène (4,259). Comme pour les LT, les MSC inhibent la prolifération des LB en les arrêtant à la phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> du cycle cellulaire. Elles inhibent également leur maturation, leur différenciation et leurs fonctions effectrices *in vitro* comme démontré par l'inhibition de l'expression des marqueurs de différenciation des LB en plasmablastes CD19 et CD38 ainsi que par la diminution de la production des différentes classes d'anticorps IgM, IgG et IgA (260,261). Les expériences de coculture indirecte par des systèmes de transwell montrent que l'effet des MSC est partiellement dû à la sécrétion de facteurs solubles notamment l'IDO (260,262). De plus, une étude conduite par Luz-Crawford *et al.* confirme l'effet inhibiteur des MSC sur la différenciation des LB *in vivo* dans un modèle murin d'arthrite induite au collagène (CIA) et met en évidence le rôle de l'IL-1RA comme un des médiateurs solubles responsables de cet effet (263).

### 2.5.1.3. Interactions avec les macrophages

Nous avons précédemment décrit le rôle des macrophages dans la perpétuation et le maintien de l'inflammation ainsi que les différents phénotypes M1/M2 qu'ils peuvent adopter. En effet, les macrophages pro-inflammatoires M1 sont les producteurs principaux des cytokines TNF, IL-6 et IL-1 et expriment à leur surface les marqueurs de co-stimulation CD40, CD80 et CD86 (64). En présence des MSC, les macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris (BMDM pour bone marrow-derived macrophages) préalablement différenciés *in vitro* avec du M-CSF et stimulés avec du LPS passent d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype pro-résolutif M2. Cela a été montré par l'inhibition des marqueurs inflammatoires IL-6, IL-1 $\beta$  et MCP-1 et par l'induction des marqueurs alternatifs IL-10, IL-4 et CD206 (264). Une autre étude a mis en évidence l'inhibition de l'expression des marqueurs d'activation CD86 et MHC-II à la surface des macrophages mis en culture en présence des MSC, accompagnée d'une réduction de la sécrétion de TNF et une augmentation de la sécrétion d'IL-10 (263). Ces résultats ont été vérifiés *in vivo* dans un modèle murin d'infarctus de myocarde où les macrophages infiltrants le myocarde injecté par des MSC présentent des marqueurs pro-résolutifs M2 telles que l'arginase-1 (Arg1) (264).



**Figure 24. Les interactions des MSC avec les macrophages.** Les MSC inhibent les macrophages pro-inflammatoires M1 et induisent la différenciation des macrophages pro-résolutifs M2 par la sécrétion d'IDO et PGE2 (265).



Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer l'effet des MSC sur les macrophages. Nous nommons en particulier la PGE2 capable de se lier aux récepteurs EP2 et EP4 à la surface des macrophages et stimuler la production d'IL-10, ainsi que le TSG-6 sécrété par les MSC en réponse au TNF présent dans le milieu et qui se lie au CD44 sur les macrophages diminuant ainsi la signalisation NF- $\kappa$ B-dépendante et la sécrétion de médiateurs inflammatoires (266,267). D'autres molécules produites par les MSC incluent l'IL-6 qui poussent les macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire producteur d'IL-10 et l'IDO impliqué dans la différenciation des monocytes en macrophages M2 immunosuppresseurs (**Figure 24**) (268,269).

#### 2.5.1.4. Interactions avec les cellules dendritiques

Le rôle essentiel des DC au cours des maladies auto-immunes est la présentation d'antigène et l'activation de l'immunité adaptative. Cependant, le passage des DC d'un état immature capable uniquement de capter les antigènes sans stimuler les LT, à un état mature caractérisé par une augmentation de l'expression de MHC-II et des marqueurs de co-stimulation CD40, CD80 et CD86 requiert une étape initiale de stimulation par des cytokines inflammatoires ou par des dérivés microbiens (270).

Les MSC sont capables d'inhiber la différenciation, la maturation et les fonctions des DC. En effet, il a été montré que les MSC inhibent la différenciation des monocytes et des cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> en DC matures *in vitro* en diminuant leur expression de HLA-DR, CD40 et CD80/CD86 d'une façon dose dépendante. Cela est accompagné par une diminution de la sécrétion d'IL-12 et une capacité réduite à stimuler les LT (271). Les DC matures préalablement différenciés *in vitro* peuvent même revenir à un état immature quand mises en coculture avec des MSC et présentent une expression diminuée de HLA-DR et CD80/CD86 (272). De plus, les MSC induisent des DC ayant des propriétés régulatrices qui sont capables d'inhiber la prolifération des LT *in vitro* et inhiber la réaction immunitaire allo-spécifique dans un modèle murin d'hypersensibilité retardée (allo-DTH) (273). Une autre étude par Yuan *et al.* a montré que la transplantation de MSC allogéniques chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé améliore leur déficience en DC CD1c<sup>+</sup> tolérogènes en périphérie (274).

L'effet des MSC est dû d'une part à un contact cellulaire direct avec les DC et d'autre part à la sécrétion de plusieurs médiateurs solubles. La neutralisation de l'IL-6, de PGE2 et de TSG-6 chez les MSC réduit leur inhibition des marqueurs de différenciation des DC suggérant ainsi un rôle central de chacune de ces molécules dans le mécanisme immunorégulateur des MSC (275–277).

#### **2.5.1.5. Interactions avec les polynucléaires neutrophiles**

Les PNN sont des acteurs importants de l'immunité innée caractérisés par une courte demi-vie et une activité phagocytaire et oxydative. Il a été montré que les MSC retardent l'apoptose des PNN, diminuent leur « burst » respiratoire par un mécanisme IL-6/STAT3-dependant et améliorent également leur activité bactéricide (278,279). Cependant, une étude par Cassatella *et al.* a montré que les MSC activées par leur TLR3 peuvent au contraire amplifier les fonctions des PNN (280). Ce phénomène sera expliqué davantage dans les pages qui suivent.

#### **2.5.1.6. Interactions avec les cellules natural killer**

Les cellules NK sont connues pour leur activité cytotoxique importante au cours de la réponse immunitaire innée et leur élimination des infections virales. Les MSC inhibent la prolifération des cellules NK stimulées avec l'IL-2 et diminuent leur cytotoxicité ainsi que leur production d'IFN- $\gamma$ . Cet effet est partiellement orchestré par la sécrétion de PGE2, IDO et TGF- $\beta$  par les MSC (281,282).

Cependant, il est important de noter que l'interaction des MSC avec les cellules NK est bidirectionnelle. En effet, sous certaines conditions d'activation avec l'IL-2, l'IL-12 et l'IL-15, les cellules NK peuvent reconnaître les MSC et induire leur mort par leur activité cytotoxique (283,284).

En se basant sur les données de la littérature élaborées dans les pages précédentes, nous pouvons donc en conclure qu'il existe plusieurs médiateurs essentiels au bon fonctionnement de

l'effet immunomodulateur des MSC. Au cours de mes travaux de thèse, je me suis focalisée sur l'étude de l'expression de l'IDO, COX2, IL-6, TSG-6, ICAM-1, VCAM-1 et PD-L1 dans le but d'évaluer le potentiel immunomodulateur des MSC et plus spécifiquement, des ADSC. Un récapitulatif de ces différents médiateurs et leur mécanisme d'action a été élaboré et présenté dans le **tableau 6** suivant à partir des références indiquées dans la dernière colonne.

<b>Molécule</b>	<b>Mécanismes d'action principaux</b>	<b>Effets sur les cellules cibles</b>	<b>Réf.</b>
<b>IDO</b>	Conversion du tryptophane dans le milieu en kynurénine	Inhibe la prolifération des LT et LB, induit des macrophages M2, inhibe la cytotoxicité des cellules NK	(245,262,268,281)
<b>PGE2</b>	Interaction avec les récepteurs EP2 et EP4, inhibition de la production d'IL-2, induction de la production d'IL-10	Inhibe la prolifération des LT et leur différenciation en lymphocytes Th1 et Th17, induit des lymphocytes Tregs, induit des macrophages M2, inhibe la maturation des DC, induit des DC tolérogènes, inhibe les fonctions des cellules NK	(247,257,266,276,283)
<b>IL-6</b>	Interaction avec l'IL-6R qui induit possiblement l'expression de l'IL-4Rα	Inhibe la maturation des DC et induit des DC tolérogènes, induit des macrophages M2, inhibe l'apoptose des PNN	(269,275,278,285)
<b>TSG6</b>	Interaction avec CD44 et diminution de la signalisation NF-κB-dépendante	Inhibe les macrophages M1	(267)
<b>ICAM-1</b>	Interaction avec LFA-1, adhésion des cellules	Inhibe la prolifération et la différenciation des LT	(239)
<b>VCAM-1</b>	Interaction avec VLA-4, adhésion des cellules	Inhibe la prolifération et la différenciation des LT	(239)
<b>PD-L1</b>	Interaction avec PD-1 à la surface des LT, transmission d'un signal co-inhibiteur	Inhibe la prolifération des LT, inhibe la différenciation des lymphocytes Th17	(249,255)

**Tableau 6. Récapitulatif des médiateurs essentiels à l'effet immunomodulateur des MSC.**

Outre le contact cellulaire et les médiateurs solubles sécrétés par les MSC, les vésicules extracellulaires dérivées des MSC sont de plus en plus étudiées aujourd'hui puisqu'elles contribuent d'une façon similaire à l'effet immunomodulateur des MSC : elles inhibent la prolifération des LB et LT et elles induisent des Tregs et des macrophages M2 pro-résolutifs (286–288). Ce mécanisme sera exploré brièvement dans la partie détaillant l'effet des MSC dans les modèles précliniques.

### **2.5.2. Influence du microenvironnement**

Bien que les MSC exercent clairement des effets immunosuppresseurs et trophiques comme vu précédemment, il existe cependant de nombreuses études qui rapportent des résultats contradictoires en ce qui concerne leur potentiel (289,290). Les MSC sont donc considérées comme des cellules présentant une certaine plasticité dans leurs fonctions immunomodulatrices. Cela peut être expliqué par la variété considérable des techniques usuelles d'isolement et d'expansion de ces cellules. En effet, l'espèce dont elles sont issues (humaine ou murine), l'origine de l'organe ou tissu (tissu adipeux, moelle osseuse, cordon ombilical, etc.), le nombre utilisé, les conditions de culture sont tous des éléments qui peuvent affecter le potentiel thérapeutique des MSC. Dans cette partie, j'ai pris la part de discuter les facteurs qui peuvent influencer les fonctions des MSC tels que les conditions de culture, leur activation par les ligands de TLR et surtout le rôle du microenvironnement inflammatoire.

#### **2.5.2.1. Conditions de culture**

Les conditions de culture des MSC peuvent affecter leurs propriétés. La teneur en oxygène (O<sub>2</sub>) dans les conditions normoxiques est de 21% ce qui est bien entendu plus élevé que les concentrations retrouvées au sein des organes du corps (1-10%) (291). Pour cela, la culture des MSC en **conditions hypoxiques** avec un pourcentage d'O<sub>2</sub> allant de 1 à 10% améliorent nettement la prolifération des MSC, leur survie et la conservation de leur caractère multipotent en les maintenant dans un état indifférencié (292,293). Certaines études ont également montré

une amélioration de l'activité paracrine des MSC par une production plus élevée d'IL-6 et des facteurs de croissance VEGF, HGF et bFGF (292,294). L'effet de l'environnement hypoxique est principalement dû à l'induction du facteur de transcription HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) qui peut à son tour interférer dans différentes voies de signalisation et induire l'expression des gènes cibles impliqués dans l'angiogenèse, la prolifération et le métabolisme des MSC (295).

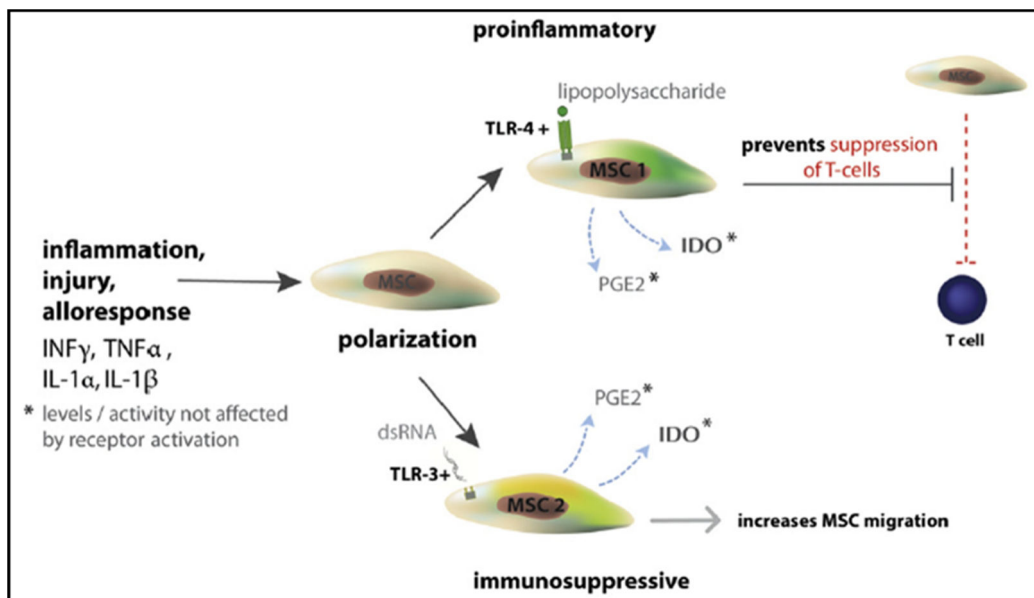
La **culture en 3D** (tridimensionnelle) est une autre stratégie pour améliorer l'effet des MSC dans le but de mimer le mieux que possible les conditions physiologiques du corps (211). De plus, une culture des MSC en sphéroïdes crée un environnement hypoxique où le noyau interne est dépourvu d' O<sub>2</sub> (296). Cette approche améliore la survie et la prolifération des MSC ainsi que leur activité immunomodulatrice, pro-angiogénique et anti-fibrotique et ce, par l'induction de l'expression des facteurs immunomodulateurs TSG6, PGE2 et IL-6 mais aussi des facteurs impliqués dans leurs effets trophiques STC-1, CXCR4 (chimiokine impliquée dans l'adhésion des MSC aux cellules endothéliales), angiogénine et VEGF, entre autres (211,297–299).

#### **2.5.2.2. Rôles des ligands des récepteurs Toll-like**

Les MSC expriment au niveau protéique différents TLR, particulièrement les TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 et TLR9 (300). L'engagement de ces TLR par leurs ligands respectifs entraîne des réponses biologiques et immunomodulatrices différentes par les MSC. En effet, de façon similaire au paradigme des lymphocytes Th1/Th2 et des macrophages M1/M2, il a été montré que les MSC peuvent adopter des fonctions pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires de type MSC1/MSC2 selon le TLR engagé (**Figure 25**). Waterman *et al.* ont montré que la liaison du LPS avec le TLR4 fait différencier les MSC vers un phénotype pro-inflammatoire avec une expression élevée d'IL-6 et IL-8 et une induction de la prolifération de LT mis en co-culture avec les MSC. D'une autre part, la liaison du poly(I:C) (acide polyinosinique-polycytidylique) avec le TLR3 polarise les MSC vers un phénotype anti-inflammatoire avec une expression élevée d'IL-4, IDO et PGE2 et conserve leur effet immunosuppresseur sur les LT (301). Cependant, contrairement à ces résultats, une étude par Liotta *et al.* a montré une inhibition de l'effet immunosuppresseur des MSC indépendamment du TLR3 ou 4 engagé, par l'inhibition de la voie de signalisation Notch induite par Jagged-1 (302).

Ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par des différences dans les conditions de culture entre les études, les concentrations de ligands utilisées et la durée du traitement (303).

Les TLR sont donc des régulateurs importants des fonctions des MSC et mériteraient des études plus approfondies et standardisées afin de mieux comprendre l'influence de leurs ligands sur le potentiel de ces cellules.



**Figure 25. Mécanisme proposé pour l'interaction des MSC avec les TLR3 et TLR4.** L'engagement du TLR4 polarise les MSC vers un phénotype pro-inflammatoire qui inhibe leur effet immunosuppresseur sur les LT tandis que l'engagement du TLR3 induit un phénotype anti-inflammatoire des MSC (301).

### 2.5.2.3. Rôle du microenvironnement inflammatoire

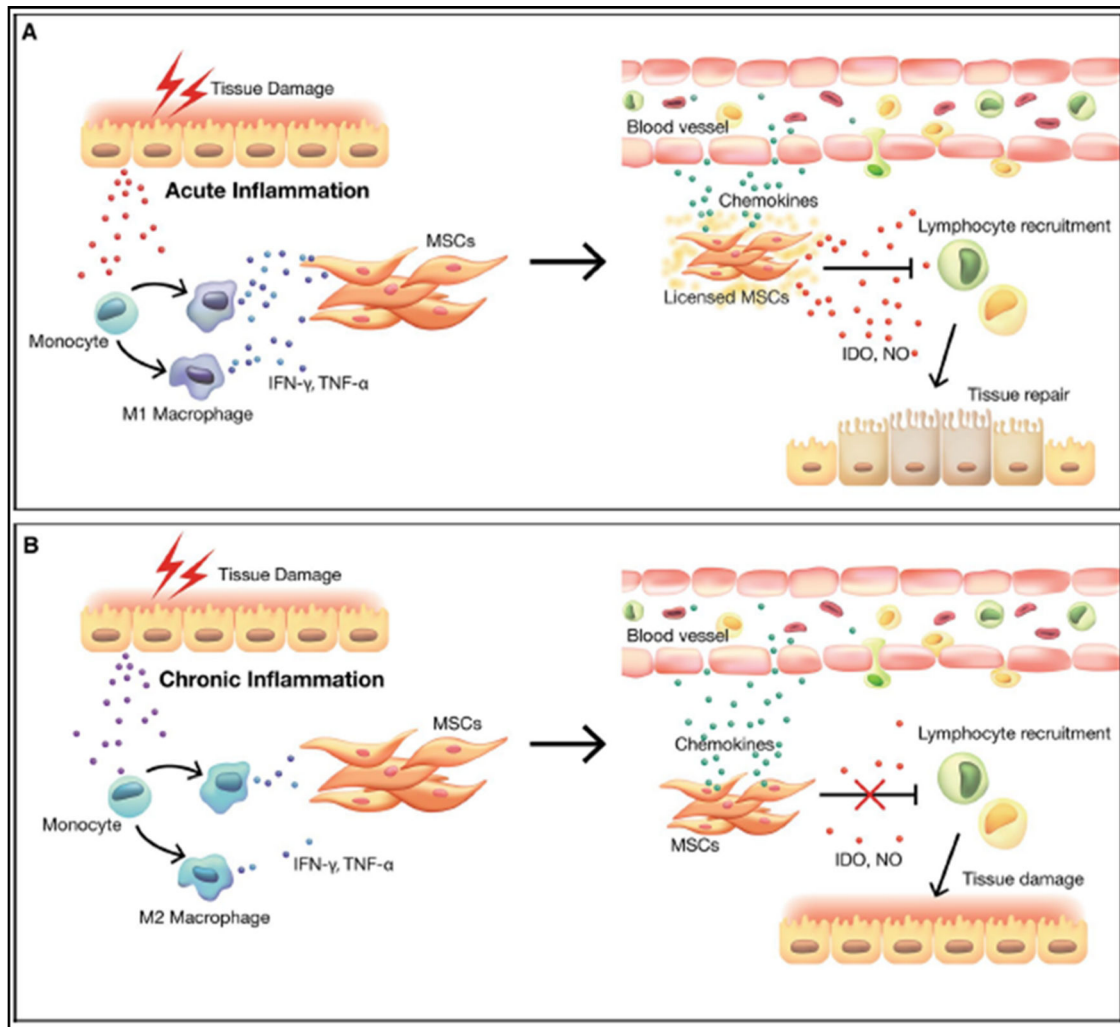
Les propriétés immunomodulatrices des MSC sont contrôlées par la complexité et l'intensité du stimulus inflammatoire (289). Nous avons mis en évidence, dans le **tableau 5** de ce manuscrit, que les MSC expriment à leur surface les récepteurs aux cytokines inflammatoires IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 et IL-6 ce qui les rendent capables de percevoir et réagir différemment aux stimulus inflammatoires (197). En effet, Ren *et al.* ont montré que les MSC ont des effets bénéfiques anti-inflammatoires considérables sur le modèle murin de la maladie du greffon contre l'hôte quand ces dernières sont injectées au cours du pic inflammatoire. Cependant, cet effet est perdu quand

un anticorps anti-IFN- $\gamma$  est injecté après l'injection des MSC WT ou encore, quand des MSC IFN $\gamma$ R1<sup>-/-</sup> sont utilisées (234).

Conformément à ces résultats, il a plus tard été montré qu'en présence de hautes concentrations d'IFN- $\gamma$  et de TNF, ces deux cytokines agissent en synergie et induisent l'expression des chimiokines CXCL9, CXCL10, RANTES, CCL3 qui recrutent à leur tour les cellules immunitaires (spécifiquement les lymphocytes) vers les MSC. Ils induisent également l'expression des molécules ICAM-1 et VCAM-1 qui facilitent l'adhésion des cellules et finalement, ils stimulent la production de grandes quantités d'IDO, iNOS, PGE2 impliqués directement dans l'effet immunosuppresseur et immunomodulateur des MSC. Ces conditions ont été comparables *in vivo* à un scénario d'inflammation aigüe où l'environnement pro-inflammatoire potentialise les MSC à inhiber les fonctions effectrices inflammatoires des cellules immunitaires et jouer un rôle dans la réparation tissulaire. En revanche, dans un scénario d'inflammation chronique ou contrôlée, où les concentrations d'IFN- $\gamma$  et TNF sont suboptimales, ces derniers induisent l'expression des chimiokines mais sont insuffisants pour induire la production des médiateurs solubles IDO et NO en grandes quantités, ce qui aurait un contre-effet : les cellules seront recrutées à proximité des MSC sans être inhibées et dans ce cas, le processus inflammatoire est aggravé (234,235,304) **(Figure 26).**

De plus, il est important de noter que l'importance du « licensing » ou l'activation des MSC vient du fait que la signalisation de l'IFN- $\gamma$  par la voie JAK-STAT1 induit l'expression de l'IDO, comme montré par Kim *et al.* (305). L'activation de la voie NF- $\kappa$ B est à son tour importante pour l'expression d'iNOS, ICAM-1 et VCAM-1 (306). Une étude par Dorronsoro *et al.* a en effet montré une inhibition de la prolifération des LT par l'activation de NF- $\kappa$ B induite par le TNF (236).





**Figure 26. La plasticité du potentiel immunomodulateur des MSC.** (A) En présence de concentrations élevées d'IFN- $\gamma$  et TNF, les MSC sont induites à sécréter des chimiokines et des médiateurs solubles IDO, NO qui inhibent les LT. (B) Des basses concentrations d'IFN- $\gamma$  et TNF stimulent les MSC à sécréter des chimiokines sans produire suffisamment d'IDO et NO pour inhiber les LT ce qui aggrave le processus inflammatoire (304).

## **Chapitre 3. Les cellules souches mésenchymateuses en application préclinique et clinique**

Par l'éventail de leurs fonctions trophiques et immunomodulatrices, les MSC sont qualifiées d'une véritable « pharmacie intrinsèque » et font l'objet d'un grand nombre d'études évaluant leur potentiel thérapeutique *in vivo* dans les maladies auto-immunes et dans les maladies ostéoarticulaires comme l'arthrose (307,308). L'avantage par rapport aux traitements traditionnels est qu'elles sont capables, par l'influence du microenvironnement, de cibler spécifiquement la réponse immunitaire sans induire une immunosuppression complète et augmenter le risque d'infections. De plus, outre leurs effets immunomodulateurs directs, les MSC stimulent les cellules souches résidentes à contribuer à l'homéostasie tissulaire et immunitaire par la sécrétion de facteurs bioactifs (228).

Dans ce chapitre qui suit, je ferai le point sur les avancées actuelles de l'utilisation des MSC dans des modèles précliniques de maladies auto-immunes et également dans des essais cliniques chez l'homme avec un intérêt particulier accordé à leur utilisation dans le traitement de la PR.

### **1. Effet dans les modèles précliniques de maladies auto-immunes**

Le potentiel thérapeutique des MSC a été évalué dans différents modèles murins de la réaction du greffon contre l'hôte (GvHD) et de maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaque, le diabète type I, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (IBD), la myasthénie grave (MG), la sclérodermie systémique (SSc), le lupus érythémateux disséminé (SLE) et la PR, avec des résultats variables (309). En effet, l'injection de MSC dans un modèle murin de sclérose en plaques, une maladie auto-immune du système nerveux central orchestrée principalement par les LT CD4<sup>+</sup>, l'EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) montre des effets bénéfiques par l'inhibition de la fréquence de lymphocytes Th17 au niveau des ganglions lymphatiques et une induction de Tregs (310). Similairement à l'EAE, l'injection de MSC dans un

modèle de colite expérimentale induite au dextran sodium sulfate améliore à son tour la sévérité de la maladie et inhibe les réponses Th1 et Th17 (311). Bien que la plupart des études *in vivo* ont montré clairement des effets bénéfiques de l'utilisation des MSC comme stratégie thérapeutique, il existe des études non négligeables qui n'ont montré aucun effet ou même une aggravation des symptômes. Par exemple, dans le modèle GvHD, Polchert *et al.* ont montré que les MSC sont efficaces seulement si injectées après la greffe de moelle osseuse quand l'environnement serait déjà inflammatoire mais n'ont aucun effet si ces dernières sont co-administrées aux souris le jour-même de la greffe (312).

Parmi les travaux multiples déjà réalisés, je résumerai une sélection d'études représentatives de l'effet des MSC dans certains modèles précliniques dans le **tableau 7** ci-dessous.

Maladie ciblée	Origine des cellules	Effet observé	Mécanisme	Réf.
<b>GvHD</b>	- BMSC murines	- Diminution de la sévérité des symptômes	- Inhibition de l'infiltration des cellules immunitaires par l'inhibition de l'expression de CCR4, CCR8 et CCR1 à leur surface	(234,312)
	- BMSC murines	- Effet bénéfique seulement si MSC administrées après la greffe de moelle osseuse et amélioration de la survie des souris	- Inhibition possible des lymphocytes Th1	
<b>Sclérose en plaques</b>	BMSC murines	Inhibition des scores cliniques avec des MSC WT Aggravation des scores cliniques avec des MSC IL17 <sup>-/-</sup>	Inhibition de lymphocytes Th17 et induction de Tregs	(310)

Maladie ciblée	Origine des cellules	Effet observé	Mécanisme	Réf.
<b>Diabète type I</b>	GMSC humaines	Inhibition de la progression de la maladie et amélioration des scores pathologiques du pancréas Diminution du taux de glucose sanguin	Inhibition de la production d'IL-17 et d'IFN- $\gamma$ par les cellules CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> de la rate et des ganglions lymphatiques	(313)
<b>IBD</b>	ADSC murines et humaines	Amélioration des symptômes cliniques et de la survie des souris	Augmentation des concentrations de TGF- $\beta$ et d'IL-10 dans le sérum Induction de Tregs dans la rate et ganglions lymphatiques	(314,315)
<b>MG</b>	BMSC murines	Amélioration des scores cliniques et de la masse corporelle des rats uniquement à des doses élevées de MSC	Induction des lymphocytes Th2 et Tregs et inhibition des lymphocytes Th1 et Th17 par un mécanisme IDO-dépendant	(316)
<b>SSc</b>	BMSC murines et ADSC humaines	Reduction de la fibrose cutanée et inhibition du dépôt de collagène	Inhibition de l'expression de TNF et IL- $\beta$ et induction du ratio MMP-1/TIMP-1 au niveau de la peau et du poumon	(317)
<b>SLE</b>	- BMSC murines  - ADSC humaines	- Aggravation des symptômes et augmentation des auto-anticorps anti-ADNdb  - Amélioration de la pathologie rénale et inhibition des anticorps anti-ADNdb	- Induction de plasmocytes dans la moelle osseuse et dépôts de complexes immuns glomérulaires  - Inhibition de lymphocytes Th1, Th17 et induction de Tregs dans la rate Inhibition de lymphocytes B effecteurs et induction de lymphocytes Bregs	(318,319)

Maladie ciblée	Origine des cellules	Effet observé	Mécanisme	Réf.
PR	- BMSC murines	- Aucun effet sur la progression de l'arthrite avec les MSC WT et les MSC IFN $\gamma$ R <sup>-/-</sup>		(320,321)
	- ADSC humaines	- Réduction de l'incidence et la sévérité de l'arthrite expérimentale	- Inhibition des lymphocytes Th1/Th17 et induction de la production d'IL-10 dans les ganglions lymphatiques et les articulations	

**Tableau 7. Effet des MSC dans des modèles précliniques de GvHD et de maladies auto-immunes.** GMSC : cellules souches gingivales, anticorps anti-ADNdb : anticorps anti-ADN double brin.

## 1.1. Effet dans les modèles précliniques de polyarthrite rhumatoïde

### 1.1.1. Etat de l'art

Tout comme les modèles murins de maladies auto-immunes, plusieurs groupes ont étudié l'efficacité des MSC dans le traitement de modèles précliniques de PR. Parmi ces modèles, celui qui a pris la plus grande part est le modèle CIA, mais il existe également d'autres modèles étudiés ponctuellement tels que l'arthrite induite par des anticorps anti-collagène (CAIA) et l'arthrite induite par l'antigène (AIA). De plus, une étude unique a été réalisée sur le modèle de souris K/BxN alors qu'aucune étude n'est notée sur le modèle de transfert de sérum K/BxN (STA), modèles qui font l'objet de mon travail de thèse. Je résumerai brièvement dans la partie suivante les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de ces modèles et leur pertinence afin de mieux comprendre l'effet observé des MSC.

**Modèle d'arthrite induite au collagène** : Le modèle CIA consiste à immuniser des lignées de rats ou souris génétiquement susceptibles, généralement souris DBA/1, avec du collagène type II émulsionné dans de l'adjuvant complet de Freund suivi d'un « boost » 3 semaines après l'immunisation initiale. Cela résulte en le développement d'une arthrite poly-articulaire à partir

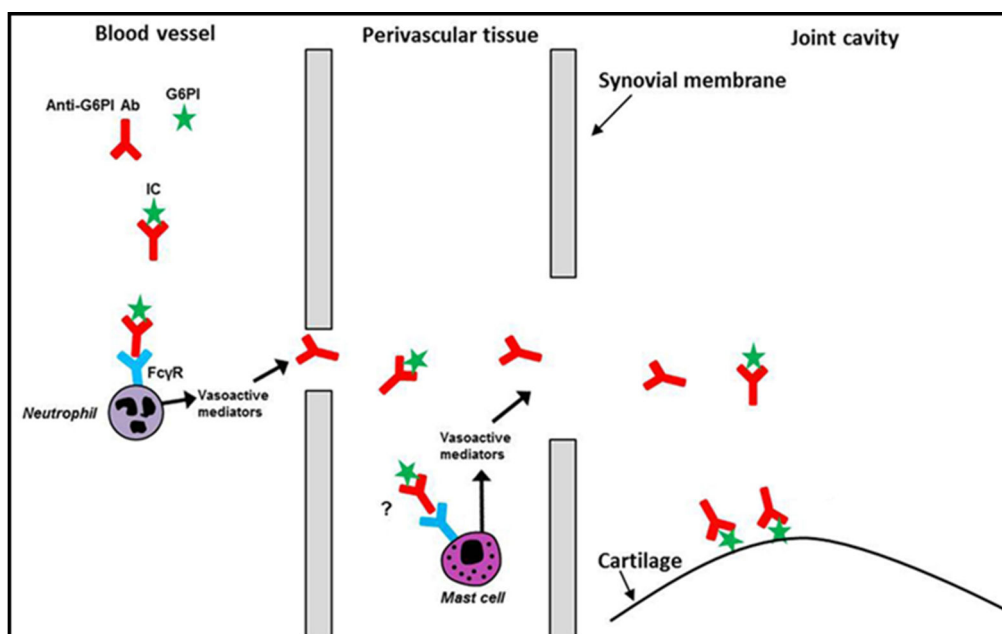
du 21<sup>ème</sup> jour (J21) qui partage des similarités avec la PR en termes d'hyperplasie synoviale, infiltration de cellules immunitaires et dégradation cartilagineuse et osseuse. La susceptibilité à la maladie est dépendante du haplotype MHC-II exprimé par les souris. Le développement de l'arthrite dans ce modèle fait intervenir principalement les LB qui produisent des anticorps anti-collagène et les LT CD4<sup>+</sup>. Une infiltration de PNN et macrophages est également observée au niveau de la synoviale (322,323). Les cytokines TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-17 sont toutes impliquées dans la pathogenèse de la CIA. L'administration d'ADSC humaines dans ce modèle améliore l'arthrite expérimentale par l'inhibition de lymphocytes Th1 auto-réactifs et la production d'IL-10 accompagnée d'une induction de Tregs au niveau de la rate (321,324). Bouffi *et al.* ont montré que les MSC murines réduisent également les signes cliniques de l'arthrite quand administrées au cours d'une fenêtre thérapeutique précise et ce, par la production de PGE2 IL-6-dépendante (248). Cependant, d'autres groupes n'ont montré aucun effet sur la progression de l'arthrite *in vivo* avec un effet immunosuppresseur des MSC observé uniquement *in vitro* (320,325).

**Modèle d'arthrite induite par anticorps anti-collagène** : Le modèle CAIA est induit par l'injection d'un cocktail d'anticorps monoclonaux anti-collagène à des souris naïves. Il s'agit d'un modèle transitoire qui survient 48 heures après l'injection d'anticorps et décline environ 1 mois plus tard. Il est indépendant des LT et LB mais est caractérisé par une infiltration importante de PNN et macrophages. Une importance particulière est accordée au TNF et l'IL-1 $\beta$  dans le développement de l'arthrite (326). L'injection systémique de MSC humaines au moment de l'apparition des symptômes diminue les signes cliniques histologiques avec une induction de lymphocytes Tregs au niveau des articulations atteintes (327).

**Modèle d'arthrite induite par l'antigène** : Le modèle AIA est induit par une injection intra-articulaire d'albumine de sérum bovin méthylée (mBSA) à des souris naïves préalablement immunisées à ce même antigène émulsionné dans de l'adjuvant complet de Freund. Bien que ce modèle présente une infiltration synoviale importante des LT CD4<sup>+</sup> et une dégradation cartilagineuse et osseuse similaire à la PR, l'arthrite reste locale au niveau de l'articulation injectée et ne présente pas de manifestation systémique (328,329). L'injection intra-articulaire de MSC humaines améliore la sévérité de la maladie et inhibe la production de TNF et la destruction cartilagineuse (330).

**Modèle spontané de souris K/BxN** : Les souris K/BxN résultent du croisement de souris C57BL/6 possédant un TCR transgénique avec des souris NOD (Non-Obese Diabetic) exprimant la molécule MHC-II Ag<sup>7</sup>. Ces souris développent une arthrite spontanée sévère et destructrice au bout de 4 semaines de vie. L'activation des LT auto-réactifs est critique à la phase d'initiation de l'arthrite et entraîne l'activation des LB en plasmocytes et leur production d'auto-anticorps dirigés contre la glucose-6-phosphate isomérase (G6PI). La formation de complexes immuns induit à son tour l'activation de la voie du complément ainsi que l'activation des PNN et des mastocytes (331,332). La seule étude sur l'effet des MSC réalisée par Papadopoulou *et al.* a montré que ces dernières sont inefficaces dans le contrôle de la maladie *in vivo* sauf si un inhibiteur de protéasome, le bortézomib est administré au moment de l'apparition des symptômes et avant l'injection des MSC. Dans ce cas-là, la diminution des scores arthritiques est accompagnée d'une diminution des scores histologiques au niveau des articulations (333).

**Modèle de transfert de sérum de souris K/BxN** : Le sérum des souris K/BxN possède un taux élevé d'auto-anticorps reconnaissant la G6PI. Il suffit de transférer ce sérum par voie intrapéritonéale (aux J0 et J2) à des souris naïves pour déclencher une réponse immunitaire et une arthrite sévère transitoire qui atteint son plateau 10 jours après le premier transfert et décline successivement. A la suite de la reconnaissance des complexes immuns à la surface des PNN et mastocytes, ces derniers sont activés et secrètent des médiateurs vasoactifs responsables de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et donc de l'infiltration des auto-anticorps et des cellules immunitaires dans l'articulation **(Figure 27)**.



**Figure 27. Phase effectrice du modèle K/BxN-STA dépendante de l'immunité innée.** Le complexe anti-G6PI/G6PI se lie à la surface des neutrophiles et mastocytes en induisant la sécrétion de médiateurs vasoactifs qui vont augmenter la perméabilité vasculaire permettant ainsi aux complexes d'infiltrer l'articulation et se lier à la surface du cartilage. Adapté de (36).

Ce modèle présente plusieurs similarités avec la PR, telles que la formation du pannus synovial, l'infiltration leucocytaire et la destruction cartilagineuse et osseuse. Cependant, sa physiopathologie est représentative de la phase effectrice de l'arthrite, elle fait principalement intervenir l'immunité innée notamment les PNN et macrophages mais est indépendante des lymphocytes T et B. De plus, ce modèle est dépendant de l'IL-1 $\beta$  avec un rôle partiel du TNF à une phase plus tardive puisque les souris TNF KO (Knock-out) sont toujours capables de développer une arthrite mais moins sévère (36,332). A notre connaissance, aucune étude n'a été rapportée jusqu'à présent concernant l'effet thérapeutique des MSC dans ce modèle.

Un récapitulatif des différents modèles murins mentionnés ci-dessus ainsi que l'effet correspondant des MSC est présenté dans le **tableau 8** suivant.



Modèle étudié	Type d'arthrite	Cellules impliquées	Effet bénéfique des MSC	Aucun effet des MSC ou aggravation
<b>CIA</b>	Induite Poly-articulaire systémique	LT, LB, PNN, macrophages	- Amélioration (321,324)  - Amélioration au cours d'une fenêtre thérapeutique précise (248)	- Aucun effet sur la progression de l'arthrite (320,325)  - Aggravation des symptômes par l'induction d'IL-6 et IL-17 sériques (334)
<b>CAIA</b>	Induite Poly-articulaire systémique	PNN, macrophages	Amélioration (327)	---
<b>AIA</b>	Induite Mono-articulaire locale	Principalement LT avec PNN, macrophages	Amélioration (330)	---
<b>K/BxN</b>	Spontanée Poly-articulaire systémique	LT, LB (phase d'induction) suivi de PNN, macrophages	Effet bénéfique si le bortézomib est administré avant injection des MSC (333)	MSC seules inefficaces (333)
<b>K/BxN-STA</b>	Induite Poly-articulaire systémique	PNN, macrophages	<i>Aucune étude rapportée sur ce modèle</i>	<i>Aucune étude rapportée sur ce modèle</i>

**Tableau 8. Effet des MSC dans des modèles précliniques de PR.**

Toutes ces études montrent clairement que l'effet des MSC dans les modèles précliniques de maladies auto-immunes et de PR, quoiqu'irréfutablement bénéfique dans certains cas, reste dépendant de plusieurs conditions. En effet, une revue par Hynes *et al.* met en évidence que parmi 30 études rapportées sur l'effet des MSC dans des modèles murins d'arthrite, 19 études ont montré des effets bénéfiques comparés à 11 études qui ont montré une absence d'effet ou une aggravation des symptômes (335). L'inconsistance de l'efficacité des MSC pourrait être due à de nombreuses variables telles que le modèle expérimental utilisé, la source et l'origine des cellules, le protocole de traitement, le « timing » des injections, le nombre de cellules

administrées, la voie d'administration (intraveineuse, intrapéritonéale ou intra-articulaire) et surtout l'environnement inflammatoire que rencontrent les MSC une fois injectées. De nouvelles stratégies ont donc été élaborées au fil des années afin de surmonter ces limitations et améliorer leur potentiel (336).

### **1.1.2. Méthodes utilisées pour améliorer le potentiel thérapeutique des MSC *in vivo***

#### **1.1.2.1. Pré-conditionnement avec des cytokines pro-inflammatoires**

Comme détaillé précédemment, il a été rapporté que le pré-conditionnement des cellules avec des concentrations élevées d'IFN- $\gamma$ , de TNF et d'IL-1 $\beta$  *ex vivo* accentue leurs effets immunosuppresseurs quand administrées *in vivo*. En effet, la stimulation des MSC par l'IFN- $\gamma$  en synergie avec le TNF induit l'expression des molécules d'adhésion et co-inhibitrices à leur surface ainsi que l'expression d'IDO, iNOS, IL-6 et PGE2 boostant ainsi leur effet sur les cellules immunitaires (235,304). Le but de cette stratégie est donc de mimer l'environnement inflammatoire théoriquement présent au cours d'une pathologie dans le but d'induire le potentiel immunomodulateur des MSC avant de les infuser. Son avantage a été effectivement montré dans un modèle de colite expérimentale où les MSC pré-stimulées avec l'IFN- $\gamma$  sont plus efficaces à limiter les lésions de la muqueuse et inhiber la réponse inflammatoire Th1 (337).

#### **1.1.2.2. Sécrétome et vésicules extracellulaires**

Dans le but de substituer l'administration directe de cellules souches vivantes et les complications qui peuvent en résulter par l'influence du microenvironnement, plusieurs groupes ont eu recours à l'utilisation des milieux conditionnés issus des cultures de MSC qui comprennent le sécrétome des cellules, dont les molécules solubles et les vésicules extracellulaires. En effet, une étude par Kay *et al.* a montré que le traitement de souris arthritiques avec des milieux conditionnés de MSC limite la dégradation cartilagineuse dans le modèle AIA et oriente l'équilibre Tregs/Th17 vers une réponse régulatrice (338). D'autres effets des milieux conditionnés ont été également détaillés dans la partie 2.4. explorant les propriétés trophiques des MSC.

D'une autre part, les vésicules extracellulaires, regroupées selon leur taille ou origine en exosomes, microvésicules ou corps apoptotiques, ont fait preuve d'un effet thérapeutique similaire à leur cellules parentales. Ces vésicules sont considérées comme des médiateurs de communication entre les différentes cellules par leur transfert de facteurs bioactifs tels que les protéines, lipides ou acides nucléique (mRNA pour messenger RNA et miRNA) qui jouent un rôle dans l'inhibition de l'inflammation (287,339). Elles induisent par exemple une polarisation de macrophages M2 pro-résolutives dans un modèle d'infarctus de myocarde par l'inhibition du TLR4 et des différentes cascades de signalisation NF- $\kappa$ B/PI3K/Akt (288). De plus, l'injection systémique des vésicules extracellulaires (plus particulièrement des exosomes) dans un modèle de CIA diminue les scores cliniques chez les souris arthritiques avec une inhibition des plasmablastes et une induction de cellules Bregs productrices d'IL-10 dans les ganglions lymphatiques (340).

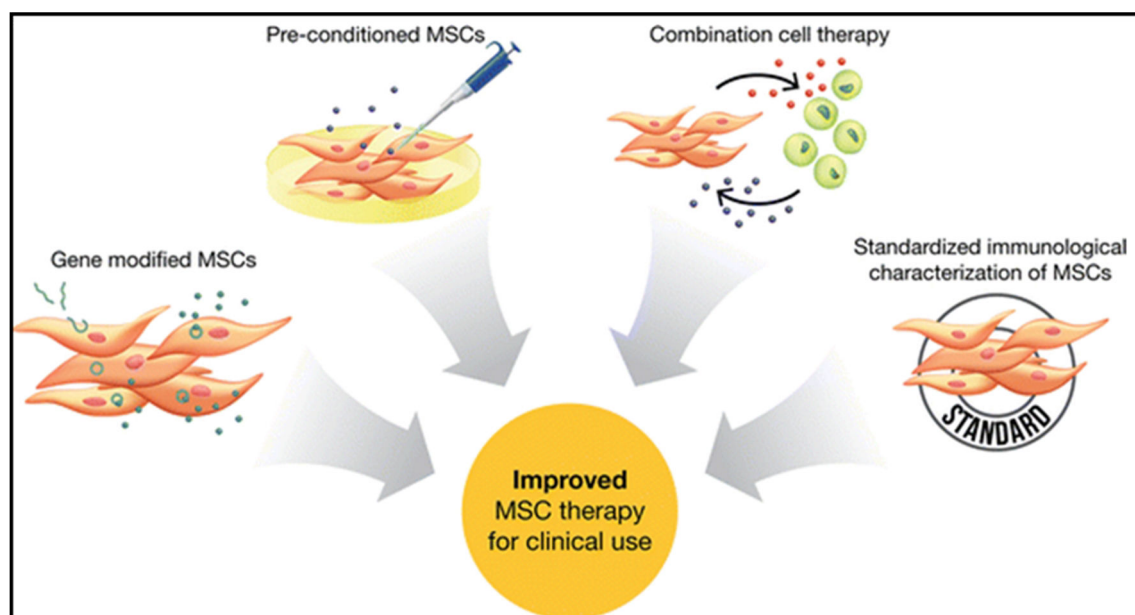
#### **1.1.2.3. Modification génétique**

Une modification génétique des MSC a été décrite par différents groupes aux fins de surexprimer des gènes importants impliqués dans leur effet anti-inflammatoire ou de délivrer une administration ciblée d'agents thérapeutiques. Par exemple, l'injection de MSC génétiquement modifiées qui surexpriment l'IL-10 ou le TGF- $\beta$  inhibe plus efficacement l'arthrite expérimentale que les MSC WT dans le modèle CIA (325,341). Les ADSC surexprimant la cytokine anti-inflammatoire IL-4 ont également démontré un effet bénéfique en diminuant les signes cliniques de l'EAE (342). D'autres groupes ont tenté de modifier génétiquement les MSC à sécréter directement des agents biologiques, tels que l'IFN- $\beta$  utilisé dans le traitement de la sclérose en plaques et l'étanercept utilisé dans le traitement de la PR et ils ont effectivement montré une inhibition de l'inflammation dans les modèles EAE et CIA, respectivement (343,344). Finalement, nous avons mentionné plus haut un rôle possible de la voie NF- $\kappa$ B dans la potentialisation des MSC. Luz-Crawford *et al.* ont en effet montré que l'utilisation de MSC déficientes pour PPAR $\beta/\gamma$  (peroxisome proliferator activated-receptor  $\beta/\gamma$ ), un inhibiteur de la

voie NF- $\kappa$ B, améliore l'effet de ces cellules dans un modèle CIA et ce, par une induction plus efficace d'ICAM-1, VCAM-1 et iNOS (306).

Malgré les avancées importantes de la modification génétique des MSC, cette stratégie nécessiterait plus d'études avant son application en clinique afin de déterminer les effets secondaires de l'administration de cellules transduites avec des vecteurs viraux et aussi déterminer leur effet systémique à long terme (345).

D'autres stratégies pour améliorer le potentiel des cellules souches mésenchymateuses ont été rapportées, notamment la standardisation des techniques d'isolement et d'expansion de ces cellules ainsi que l'optimisation de leurs conditions de culture *ex vivo* (présence ou absence d'un milieu hypoxique, culture tridimensionnelle, etc.) (211). L'utilisation des MSC en combinaison avec le transfert simultané de lymphocytes Tregs a été aussi proposée comme une stratégie d'amélioration des effets de la thérapie cellulaire (336) (**Figure 28**).



**Figure 28. Méthodes proposées pour améliorer le potentiel thérapeutique des MSC.** Vu les résultats contradictoires de l'effet des MSC *in vivo*, l'utilisation de MSC préconditionnées ou génétiquement modifiées, l'utilisation d'une thérapie cellulaire combinée ou l'établissement de techniques standards de leur expansion pourront améliorer leur potentiel thérapeutique (304).

## 2. Essais cliniques dans les maladies auto-immunes

La première utilisation clinique des MSC était rapportée en 2004 par Le Blanc *et al.* dans le cas d'un patient atteint de GvHD réfractaire au traitement par stéroïdes (346). La survie de ce patient à la suite de l'infusion de MSC a formé un socle solide pour le lancement d'une multitude d'essais cliniques évaluant l'effet des MSC dans les maladies auto-immunes. Aujourd'hui, nous dénombrons 53 essais cliniques confirmés comme complétés ou en cours de recrutement dont 10 sur la polyarthrite rhumatoïde (source : <https://clinicaltrials.gov/>). Bien que la majorité de ces études soient toujours à la phase I/II et que celles-ci incluent un nombre limité de patients et que certaines manquent de contrôles nécessaires (études randomisées en double-aveugle et contrôle contre placebo), une efficacité prometteuse des MSC a été mise en évidence dans les maladies auto-immunes et l'arthrose (347,348). De plus, ces études ont démontré la faisabilité des injections de MSC chez les patients sans effets secondaires majeurs ni de risques sur le plan clinique (349).

L'infusion locale de  $120 \times 10^6$  d'ADSC chez les patients atteints de la maladie de Crohn, une maladie inflammatoire auto-immune du gros intestin, résulte en la guérison des fistules dans 50% des 107 patients traités au cours d'un essai phase III randomisé double-aveugle (350). Cependant, une autre étude phase I n'a montré une amélioration de l'indice d'activité de la maladie que dans 30% des 10 patients ayant reçu une injection systémique de  $1-2 \times 10^6$  cellules/Kg MSC (351). Une étude phase II sur la sclérose en plaques qui inclut 9 patients a montré que l'administration intraveineuse de  $1-2 \times 10^6$  MSC/Kg ne pose pas de risques avec une tendance vers l'inhibition des lésions observées par imagerie par résonance magnétique sans cependant refléter les mêmes effets bénéfiques observés avec les modèles pré-cliniques (352). A la suite des premières études montrant la tolérance des MSC chez les patients atteints de SLE, un essai clinique phase II sur 81 patients réfractaires aux thérapies conventionnelles et ayant reçu  $1 \times 10^6$  de MSC/Kg par voie intraveineuse a mis en évidence une rémission clinique à long terme dans 34% de ces patients, même après 5 ans de suivi (353).

## 2.1. Essais cliniques dans la polyarthrite rhumatoïde

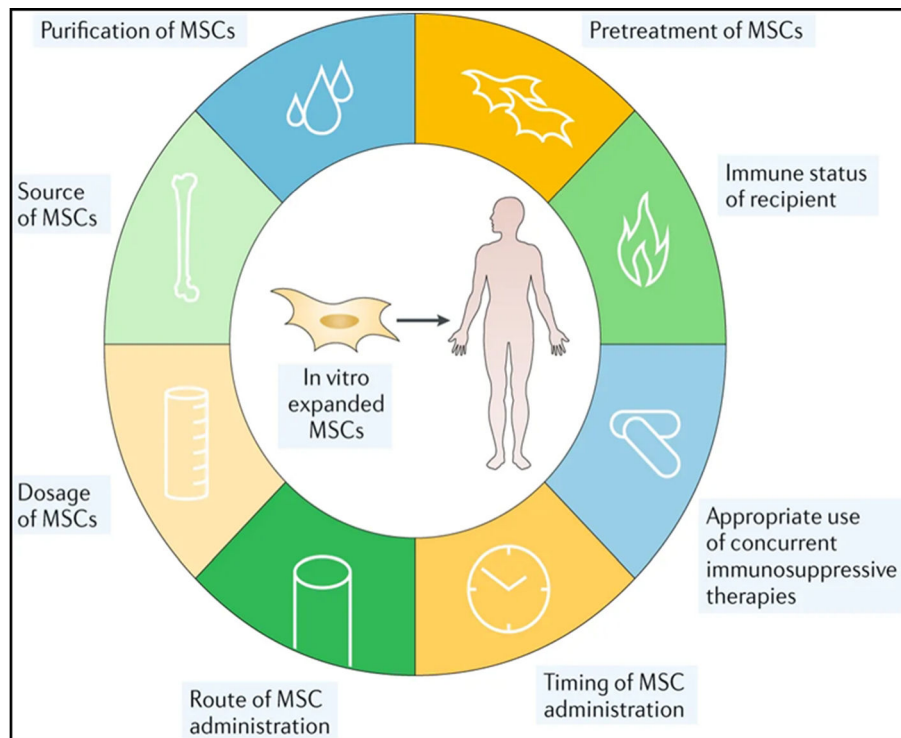
En ce qui concerne les essais cliniques sur la polyarthrite rhumatoïde, il existe aujourd'hui 6 études complétées qui évaluent l'effet des MSC. Ces essais ont tous montré la pertinence et la sécurité de l'utilisation des MSC chez les patients mais possèdent encore de nombreuses limitations en termes d'efficacité de ces cellules (**Tableau 9**). En effet, la plupart des études montrent une tendance vers l'amélioration des symptômes et des effets bénéfiques, certes variables, mais prometteurs. L'attention accordée aux MSC se porte sur leur capacité à moduler la réponse inflammatoire et restaurer la tolérance immunitaire chez les patients en limitant les dégâts au niveau de l'articulation.

	Détails de l'étude	Source de MSC	Dose et voie d'administration	Effet primaire	Réf.
<b>Liang <i>et al.</i>, 2012</b>	Phase II 4 patients, absence de contrôle	BMSC ou UC-MSC	Injection intraveineuse de $1 \times 10^6$ MSC/Kg	Amélioration transitoire des paramètres cliniques (ESR, DAS-28) chez 75% des patients sans atteindre une rémission	(354)
<b>Wang <i>et al.</i>, 2013</b>	Phase I/II 136 patients DMARDs+MSC et 36 patients contrôles DMARDs seuls	UC-MSC	Injection intraveineuse de $4 \times 10^7$ de MSC	Effet bénéfique transitoire chez 50% des patients pour 3-6 mois après injection avec induction de Tregs en périphérie	(355)
<b>Álvaro-Gracia <i>et al.</i>, 2017</b>	Phase I/II randomisée double-aveugle 46 patients MSC (doses variables) et 7 patients placebo	ADSC	Injection intraveineuse de $1-4 \times 10^6$ MSC/Kg	Injections bien tolérées avec une tendance vers une efficacité clinique (32% des patients au 1 <sup>er</sup> mois) qui mériterait plus d'études. Pas de modification de Tregs en périphérie	(356)

	Détails de l'étude	Source de MSC	Dose et voie d'administration	Effet primaire	Réf.
<b>Shadmanfar et al., 2018</b>	Phase I/II randomisée triple-aveugle 15 patients MSC et 15 patients placebo	BMSC	Injection intra-articulaire de $42 \pm 4 \times 10^6$ MSC	Faisabilité et tolérance des injections intra-articulaires. Amélioration des symptômes cliniques jusqu'à 12 mois après injection	(357)
<b>Park et al., 2018</b>	Phase IA 9 patients MSC (doses variables), absence de contrôle	UC-MSC	Injection intraveineuse de $25-100 \times 10^6$ MSC	Pas de toxicité rapportée avec une diminution significative du DAS-28 à 4 semaines	(358)
<b>Ghoryani et al., 2019</b>	Phase I 9 patients MSC, absence de contrôle	BMSC	Injection intraveineuse de $1 \times 10^6$ MSC/Kg	Amélioration du DAS-28 à 1 et 12 mois. Tendance vers l'inhibition de lymphocytes Th17 à 12 mois et induction de Tregs à 1 mois	(359)

**Tableau 9. Effet des MSC dans les essais cliniques de PR.** UC-MSC : Umbilical cord mesenchymal stem cells, ESR : Erythrocyte sedimentation rate.

Malgré l'amélioration des paramètres cliniques observée chez les patients traités par les MSC par une inhibition des LT pro-inflammatoires et une induction des Tregs, le tableau 9 met cependant en évidence la grande variabilité des protocoles de traitement adoptés entre les études ainsi que les différences entre le choix des patients, la source des cellules, les doses et voies d'administration qui sont tous des éléments clés à prendre en considération afin d'améliorer le potentiel immunomodulateur des cellules injectées (360) (**Figure 29**). La compréhension de l'effet des MSC dans le traitement de la PR nécessiterait des investigations approfondies recrutant un plus grand nombre de patients et un suivi à long terme.



**Figure 29. Éléments clés à prendre en compte pour l'amélioration clinique des MSC.** La technique de purification des MSC, le pré-traitement, le statut inflammatoire du receveur, le timing d'administration, la dose et la voie d'administration sont des paramètres à optimiser pour une meilleure application clinique des MSC (360).



---

# Objectifs de la thèse

---

Au cours de l'introduction, nous avons vu que les MSC, y compris les ADSC, exercent un effet trophique et possèdent un potentiel immunomodulateur important sur les cellules immunitaires par contact cellulaire (PD-L1, ICAM-1, VCAM-1) et par la sécrétion de médiateurs solubles (IDO, PGE2, IL-6, TSG-6). Cependant, malgré les effets bénéfiques observés *in vitro* et dans plusieurs modèles murins de polyarthrite rhumatoïde, leur efficacité n'a toujours pas été clairement démontrée dans un contexte clinique. Il est en effet suggéré, par des études réalisées *in vitro* évaluant l'effet de différentes concentrations de cytokines inflammatoires sur les MSC, que le microenvironnement pourrait affecter les capacités immunomodulatrices des cellules.

**Pour cela, dans le but de mieux comprendre comment le microenvironnement et plus précisément comment l'inflammation pourrait moduler le potentiel thérapeutique des ADSC, mes travaux de thèse se sont articulés autour de deux approches différentes : une approche *in vitro* qui a eu recours à des échantillons de patients atteints de PR et une approche *in vivo* employant deux modèles d'arthrite expérimentale (K/BxN et K/BxN-STA).**

**1. Approche *in vitro* :** Une première approche translationnelle a consisté à :

- Etudier l'effet des liquides synoviaux de patients atteints de PR sur le phénotype, la prolifération et l'expression des gènes impliqués dans l'effet immunomodulateur des ADSC et à établir une corrélation avec leur statut inflammatoire.
- Identifier les médiateurs présents dans les SF responsables de cet effet ainsi que les mécanismes impliqués.
- Evaluer si le conditionnement des ADSC par ces liquides synoviaux affecte fonctionnellement leur capacité à moduler le phénotype des lymphocytes T et macrophages.

*Les résultats de cette première approche ont fait l'objet d'un article publié dans le journal Frontiers in Immunology et seront présentés dans la Partie 1 des Résultats.*

2. **Approche *in vivo*** : Une deuxième approche a consisté à évaluer l'effet des injections d'ADSC sur la progression de l'arthrite dans le modèle spontané de souris K/BxN et dans le modèle d'arthrite transitoire induite par transfert de sérum K/BxN (STA). Au cours de cette partie, nous avons voulu déterminer si le modèle utilisé ainsi que les mécanismes impliqués dans sa physiopathologie pourraient affecter le potentiel thérapeutique des ADSC. Nous avons également évalué l'effet des injections à différents stades de l'arthrite murine et par différentes voies d'administration.

*Les résultats de cette seconde approche seront présentés dans la Partie 2 des Résultats.*

---

# Résultats

---

## Partie I

### **Article: Rheumatoid Synovial Fluids Regulate the Immunomodulatory Potential of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Through a TNF/NF- $\kappa$ B-Dependent Mechanism**

Souraya Sayegh, Oula El Atat, Katy Diallo, Benjamin Rauwel, Yannick Degboé, Etienne Cavaignac, Arnaud Constantin, Alain Cantagrel, Viviane Trak-Smayra, Nada Alaaeddine and Jean-Luc Davignon

Front Immunol. 2019 Jun 28;10:1482. doi: 10.3389/fimmu.2019.01482. eCollection 2019.

Comme présenté dans l'introduction, l'intérêt majeur de l'utilisation des ADSC dans les maladies auto-immunes est leur capacité immunomodulatrice grâce à la sécrétion de facteurs solubles et les contacts cellule-cellule. Cependant, les ADSC ne sont pas constitutivement immunomodulatrices mais le deviennent après stimulation par un environnement inflammatoire. Bien qu'il existe une multitude d'études qui a démontré l'effet bénéfique des ADSC, ces études n'ont toujours pas été traduites en clinique. Cela pourrait effectivement être dû à l'absence d'un environnement inflammatoire adéquat *in vivo* qui empêche le « licensing » des ADSC.

La PR est une maladie auto-immune débilitante qui met en jeu différents acteurs de l'immunité innée et adaptative qui infiltrant l'articulation. Elle devient le siège d'une synovite chronique aboutissant à une dégradation cartilagineuse et osseuse. L'inflammation ayant lieu au niveau des articulations des patients est reflétée par un liquide synovial riche en cytokines pro-inflammatoires. L'objectif de ce travail était donc de déterminer le rôle du microenvironnement articulaire représenté par les SF de patients atteints de PR (RASf) sur le potentiel immunomodulateur des ADSC.

Le statut inflammatoire des RASF collectés était d'abord déterminé par une historique du patient, l'analyse cytologique du SF et la quantification de cytokines pro-inflammatoires. Dans cette étude, nous avons montré que tous les RASF maintiennent le phénotype des ADSC ainsi que leur capacité à proliférer. De plus, les RASF déterminés comme pro-inflammatoires induisent l'expression des gènes COX-2, IDO, IL-6, TSG-6, ICAM-1, VCAM-1 and PD-L1 impliqués dans le potentiel immunomodulateur des ADSC mais à des degrés différents, en fonction de leur statut inflammatoire. Le seul RASF désigné comme peu inflammatoire inhibe l'expression de TSG-6 et a une tendance à inhiber les autres gènes étudiés. Une corrélation a été en effet observée entre les concentrations de TNF dans les RASF et l'induction de COX2, TSG-6, VCAM1, PD-L1 et entre les concentrations d'IL-6 et l'induction de PD-L1. Dans un deuxième temps, nous avons montré que l'effet des SF est directement médié par la voie de signalisation TNF/NF- $\kappa$ B et partiellement par l'IL-6 comme démontré par les tests d'inhibition du TNF, IL-6 et NF- $\kappa$ B ou par l'ajout de cytokines recombinantes. De plus, le pré-traitement des ADSC avec les RASF inflammatoires renforce leur capacité à moduler les marqueurs pro-inflammatoires des macrophages (CD40 et CD80) et à induire des lymphocytes Tregs, contrairement au RASF peu inflammatoire qui réduit la capacité des ADSC à moduler le phénotype des macrophages et des Tregs.

En conclusion, cette partie met en avant pour la première fois le rôle essentiel des liquides synoviaux rhumatoïdes pro-inflammatoires dans la potentialisation des ADSC. La quantification du TNF et IL-6 dans le liquide articulaire des patients pourrait effectivement prédire l'efficacité des ADSC *in vivo*. Leur « licensing » par une injection intra-articulaire directe dans un environnement suffisamment inflammatoire serait donc un moyen pour maximiser leurs effets thérapeutiques.



# Rheumatoid Synovial Fluids Regulate the Immunomodulatory Potential of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Through a TNF/NF- $\kappa$ B-Dependent Mechanism

Souraya Sayegh<sup>1,2,3</sup>, Oula El Atat<sup>3</sup>, Katy Diallo<sup>1,2</sup>, Benjamin Rauwel<sup>1</sup>, Yannick Degboé<sup>1,4</sup>, Etienne Cavaignac<sup>5</sup>, Arnaud Constantin<sup>1,2,4</sup>, Alain Cantagrel<sup>1,2,4</sup>, Viviane Trak-Smayra<sup>3</sup>, Nada Alaaeddine<sup>6\*</sup> and Jean-Luc Davignon<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, INSERM UMR 1043, Toulouse, France, <sup>2</sup> Université Paul Sabatier Toulouse III, Toulouse, France, <sup>3</sup> Faculté de Médecine, Université Saint-Joseph, Beirut, Lebanon, <sup>4</sup> Centre de Rhumatologie, CHU de Toulouse, Toulouse, France, <sup>5</sup> Centre de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique, CHU de Toulouse, Toulouse, France, <sup>6</sup> Faculty of Medical Sciences, Neuroscience Research Center, Lebanese University, Beirut, Lebanon

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Massimo Gadina,  
National Institute of Arthritis and  
Musculoskeletal and Skin Diseases  
(NIAMS), United States

### Reviewed by:

Anna Scanu,  
University of Padova, Italy  
Akio Morinobu,  
Kobe University, Japan

### \*Correspondence:

Nada Alaaeddine  
nada.aladdin@gmail.com  
Jean-Luc Davignon  
jean-luc.davignon@inserm.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Inflammation,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 08 February 2019

Accepted: 13 June 2019

Published: 28 June 2019

### Citation:

Sayegh S, El Atat O, Diallo K, Rauwel B, Degboé Y, Cavaignac E, Constantin A, Cantagrel A, Trak-Smayra V, Alaaeddine N and Davignon J-L (2019) Rheumatoid Synovial Fluids Regulate the Immunomodulatory Potential of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Through a TNF/NF- $\kappa$ B-Dependent Mechanism. *Front. Immunol.* 10:1482. doi: 10.3389/fimmu.2019.01482

**Introduction:** Adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSC) have been shown to have remarkable immune-modulating effects. However, their efficacy in clinical trials has yet to be fully demonstrated. This could be due to a lack of a proper inflammatory environment *in vivo* that primes ADSC. Here, we define how the articular microenvironment of rheumatoid arthritis (RA) patients modulates the therapeutic efficiency of ADSC.

**Methods:** Synovial fluids (SF) were collected from 8 RA patients, 2 Spondyloarthritis patients and one control synovial fluid from a patient undergoing traumatic-related surgery. SF inflammatory status was determined by routine analysis and quantification of pro-inflammatory cytokines. ADSC were first treated with SF and ADSC proliferation and gene expression of immunomodulatory factors was evaluated. In order to determine the mechanisms underlying the effect of SF on ADSC, tumor necrosis factor (TNF), interleukin-6 (IL-6), and NF- $\kappa$ B neutralization assays were performed. To evaluate the effect of SF on ADSC functions, ADSC were pre-treated with SF and then co-cultured with either macrophages or T cells. The modulation of their phenotype was assessed by flow cytometry.

**Results:** Pro-inflammatory RASF maintained the proliferative capacity of ADSC and upregulated the gene expression of cyclooxygenase-2 (COX2), indoleamine-1,2-dioxygenase (IDO), interleukin-6 (IL-6), tumor-necrosis factor stimulated gene 6 (TSG6), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and programmed death-ligand 1 (PD-L1), all factors involved in ADSC immunomodulatory potential. The RASF-induced gene expression was mainly mediated by TNF alone or in combination with IL-6 and signaled through the NF- $\kappa$ B pathway. Conditioning ADSC with pro-inflammatory RASF enhanced their ability to induce CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells (Tregs) and inhibit pro-inflammatory markers CD40 and CD80 in activated macrophages.

**Conclusions:** Inflammatory synovial fluids from RA patients had the capacity to modulate ADSC response, to induce Tregs and modulate the phenotype of macrophages. The clinical use of ADSC in affected joints should take into account the influence of the local articular environment on their potential. Having a sufficient pro-inflammatory microenvironment will determine whether optimal immunoregulatory response should be expected. Direct ADSC intra-articular delivery to patients could be a potential strategy to properly prime their immunomodulatory potential and enhance their clinical benefits.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, rheumatoid arthritis, synovial fluid, immunomodulation, TNF, NF- $\kappa$ B, Tregs, macrophages

## INTRODUCTION

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent cells with the ability to differentiate into different cells of mesodermal lineage making them a potential candidate for regenerative therapy (1). Over the years, MSC have been successfully isolated from several tissues including bone marrow, umbilical cord, and adipose tissue (2, 3). Their undeniable appeal comes from the fact that they are immune-evasive with a lack of expression of MHC-II molecules (4), are easily expanded *ex vivo* (4) but most importantly, that they possess immune-modulating abilities through both the secretion of soluble mediators and cell-to-cell contact-dependent mechanisms (5).

MSC are not constitutively immunomodulatory but become so upon stimulation with pro-inflammatory cytokines, mainly interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) alone or in combination with tumor necrosis factor (TNF) or interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (6, 7) or TNF alone (8). Following their activation, MSC suppress the proliferation and effector function of pro-inflammatory immune cells that orchestrate the pathophysiology of autoimmune diseases such as T lymphocytes, B lymphocytes, macrophages, dendritic cells, and natural killer cells (NK cells) (9–13). In fact, upon encountering a pro-inflammatory environment, they upregulate their production of chemokines and adhesion molecules such as vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) (14). This

leads to the recruitment and subsequent inhibition of pro-inflammatory cells through a co-inhibitory signal transmitted by programmed death-ligand 1 (PD-L1) for T cells (15) but also through MSC production of high levels of immune inhibitory factors such as prostaglandin E2 (PGE2), indoleamine-1,2-dioxygenase (IDO), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) and tumor-necrosis factor stimulated gene 6 (TSG6) for T cells, macrophages, and NK cells (5, 16, 17). Furthermore, MSC have been shown to not only suppress the proliferation of pro-inflammatory cells but also to generate regulatory T cells (Tregs) and skew macrophages to a pro-resolving anti-inflammatory profile as demonstrated *in vitro* in co-culture settings (18, 19) and *in vivo* in rheumatoid arthritis (RA) murine models such as collagen-induced arthritis (CIA) amongst others (20, 21).

Even though it has been well-established that MSC exert an immunomodulatory effect *in vitro* and in animal models of autoimmune diseases, this clear-cut effect is yet to be seen in human clinical trials (22, 23). This could be due to several factors, one of which is the lack of an appropriate inflammatory stimulus *in vivo* which hinders the proper activation of MSC (7). A proper delivery of MSC to inflamed sites could therefore help enhance their clinical application.

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune inflammatory disease characterized by chronic synovitis and progressive bone and cartilage destruction (24). The local inflammatory environment in rheumatoid joints is the result of an interplay between pro-inflammatory Th1 and Th17 cells, infiltrating macrophages that secrete pro-inflammatory cytokines and B cells production of autoantibodies (25). These clinical aspects are mirrored by a synovial fluid rich in pro-inflammatory mediators be it cytokines, growth factors and chemokines, immune complexes, damage-associated molecular patterns (DAMPs) or genetic material (microRNA) (26–28). All these mediators could have a potential role in directing the immunomodulatory function of MSC as either an inhibitor of inflammation or even a promoter when the absence of an adequate inflammatory environment leads to an insufficient production by MSC of anti-inflammatory factors.

Adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSC) are MSC that share similar properties with bone marrow-derived stem cells (BM-MSC) but have the advantage of being more easily isolated with a higher cell yield and an increased proliferative

**Abbreviations:** ADSC, Adipose-derived mesenchymal stem cells; BM-MSC, bone marrow-derived stem cells; CCL/CXCL, Chemokine ligand; CD, cluster of differentiation; CTL, control; DAS 28-CRP, disease activity score 28 using C-reactive protein; Cyclooxygenase-2, COX2; DMEM/F12, Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FBS, fetal bovine serum; Foxp3, forkhead box p3; HLA-DR, human leukocyte antigen-DR isotype; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; MSC, mesenchymal stem cells; NK cells, natural killer cells; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; IDO, indoleamine-1,2-dioxygenase; IFN- $\gamma$ , interferon gamma; IL, interleukin; IL-1ra, interleukin-1 receptor antagonist; LPS, lipopolysaccharide; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; PD-L1, programmed death-ligand 1; PGE2, prostaglandin E2; PMA, phorbol myristate acetate; PS, penicillin-streptomycin; RA, rheumatoid arthritis; SpA, Spondyloarthritis; RPS9, ribosomal protein S9; STC1, stanniocalcin-1; SVE, stromal-vascular fraction; TGF- $\beta$ , transforming growth factor beta; TIMP3, tissue inhibitor of metalloproteinases 3; TNE, tumor necrosis factor; TSG6, tumor-necrosis factor stimulated gene 6; Th, T helper; Tregs, regulatory T cells; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1.



capacity (29). As per our knowledge, there has been thus far no report on the behavior of ADSC within a synovial environment.

In this study, we addressed the role of the articular microenvironment of RA patients on ADSC efficiency as a therapeutic agent. We investigated whether synovial fluid from inflamed arthritic joints could modulate the proliferation and immunomodulatory potential of ADSC. Our findings demonstrate that having an ample pro-inflammatory synovial environment is of critical importance to enhance ADSC's therapeutic effects. This suggests that a direct intra-articular delivery to sufficiently inflamed joints would better contribute to the clinical use of ADSC in RA.

## METHODS

### Synovial Fluid Collection

Synovial fluid was obtained from 8 RA patients, 2 Spondyloarthritis (SpA) patients and one control synovial fluid from a patient undergoing a traumatic-related surgery. Informed written consent was obtained and the study protocol was approved by the CHU Toulouse ethics committee (BioTOUL DC 2016-2804). RA patients fulfilled the criteria for the ACR/EULAR 2010 and SpA patients the criteria for the ASAS. All RA patients had active joint inflammation and were taken in charge in the Rheumatology Department of the Toulouse University Hospital. SF was collected during therapeutic arthrocentesis. Samples of SF were sent to the hospital laboratories for routine analysis. Analysis results along with patients' blood tests and medical history allowed a full assessment of inflammation taking place at the time of sample collection.

SF were transferred to heparin-treated tubes, treated with hyaluronidase 0.5 mg/mL (H3884, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 min at room temperature and centrifuged to exclude cells and debris. Samples were then filtered on a pore size of 0.2  $\mu$ m to exclude remaining macromolecules and frozen in aliquots at  $-80^{\circ}\text{C}$  for later use.

### Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Isolation and Characterization

Human ADSC were isolated from adult subcutaneous adipose tissue of patients undergoing elective abdominal lipectomy procedures as previously described (30). The study was carried out after obtaining informed written consent and the approval of the Université Saint-Joseph ethics committee (CEHDE 733). Briefly, adipose tissue samples were first digested in Hank's Balanced Salt Solution (Lonza, Walkersville, MD, USA) containing 0.075% collagenase type I (Sigma-Aldrich) for 1 h under gentle agitation at  $37^{\circ}\text{C}$  and then centrifuged to obtain the stromal-vascular fraction (SVF). SVF was filtered through a 100  $\mu$ m nylon membrane, resuspended in Red blood cell lysis buffer (Sigma-Aldrich) for 10 min and washed with phosphate buffered saline (PBS, Lonza) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Lonza). The isolated SVF were plated in T175 tissue culture flasks containing Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12 medium (DMEM/F12, Gibco, Invitrogen, Waltham, MA, USA) supplemented with 10%

fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich) and 1% penicillin-streptomycin (PS, Lonza). Two days later, non-adherent cells were washed off and fresh media was added. Cells were trypsinized and plated for subculture when they reached 80% confluency. All experiments were performed using ADSC from early passages (P3–P5).

According to the criteria of the International Society for Cellular Therapy, ADSC were immunophenotyped for their cellular expression of CD73, CD105, CD90, CD44, CD45, CD31, CD34, and HLA-DR in addition to their multilineage differentiation capacity into chondrocytes, adipocytes and osteoblasts as previously described (30).

### Cytokine Quantification

Synovial fluid mediators were determined by screening pro-inflammatory cytokines on three SF using a membrane-based Human Cytokine Array kit (ARY005B, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The chemiluminescent signals were visualized with a ChemiDoc XRS+ imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and analyzed using Image Lab 5.0. IL-6 and IFN- $\gamma$  levels were quantified by ELISA according to the manufacturer's instructions (R&D Systems). Concentrations of MCP-1 levels were determined by Cytometric Bead Array (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Data was acquired on an LSRII cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FCAP array v3 software (BD Biosciences). Quantification of IL-1 $\beta$ , IL-23, IL-12p70, IL-12p40, CCL17, CXCL10, IL-10, and IL-1RA in SF was performed by the LegendPlex Human M1/M2 Macrophage Panel (BioLegend, San Diego, CA, USA). Data was acquired on a MACSQUANT Q10 cytometer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and analyzed using Legendplex Data Analysis Software (BioLegend).

IL-6 and TIMP3 were quantified in ADSC culture supernatants by ELISA (R&D Systems).

### ADSC Proliferation Assay

Cell proliferation was assessed using a tetrazolium-based MTS colorimetric assay. In order to determine the best SF concentration to use, ADSC were first seeded in a 96 flat-bottomed well plate ( $10^4$  cells/well) for 24 h and then treated with serum-free media containing increasing concentrations of either SF control (CTL) or RA1 (5, 25, 50%) for 48 h. CellTiter 96 Aqueous One solution (Promega, Madison, WI, USA) was added for an additional 2 h and formazan crystals were quantified using the Varioskan Flash spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For all subsequent experiments, the different synovial fluids were used at a 5% concentration.

### ADSC and SF Treatment Protocols

To determine the effect of SF on the expression of immunomodulatory genes (Cyclooxygenase-2; COX2, IDO, IL-6, TSG6, TGF- $\beta$ ), immunosuppressive genes (ICAM-1, VCAM-1, PD-L1) or other genes expressed by ADSC (stanniocalcin1; STC-1, tissue inhibitor of metalloproteinases 3; TIMP3), ADSC were seeded in 24-well plates overnight. The following day, media was aspirated, and adherent cells were washed with PBS and cultured in serum-free media in the

presence of 5% SF from either control, SpA, or RA patients for 24 h. For each experiment, SF control and SpA served as controls.

To determine the effect of TNF and IL-6 present in SF on ADSC gene expression, cells were cultured in the presence of SF CTL, RA1, or RA8 with or without anti-IL6R and/or anti-TNF (10 µg/mL) and RA8 in the presence of recombinant IL-6 (570 pg/mL) and TNF (50 pg/mL) (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) added at the same concentrations that were detected in RA1. RA8 in the presence of recombinant TNF at 10 ng/mL served as a positive control. To assess the role of NF-κB signaling in the effect of SF on ADSC, cells were pre-treated with either vehicle or the specific inhibitor of NF-κB activation caffeic acid phenethyl ester CAPE 20 µM (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) for 2 h followed by 24 h stimulation with SF CTL, RA1, or RA8.

## Gene Expression Analysis

Total RNA was extracted from ADSC with High Pure RNA isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and 0.5 µg was reverse transcribed using RevertAid Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). Real-time quantitative PCR was performed with the Light Cycler 480 System Instrument using the LC480 SYBR green Master Mix (Roche Diagnostics GmbH). Primers were synthesized by Sigma Life Science (St. Quentin Fallavier, France) (Table S1). All values were normalized to the housekeeping gene RPS9 and expressed as fold change compared to SF control using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

## Western Blot

ADSC were cultured for 6 h in the presence of SF CTL, RA1, or RA8. Protein extracts were lysed in 50 µL Laemmli Buffer, denatured at 95°C for 10 min and then sonicated. Extracts were run on Novex NuPAGE 4–12% Bis-Tris mini gels, transferred to a nitrocellulose membrane (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) and probed with antibodies against IκB and Histone H3 (BioLegend) followed by HRP-conjugated secondary antibodies. The bands were visualized with a ChemiDoc XRS+ imaging system (Bio-Rad). All images were analyzed using Image Lab 5.0. IκB expression was normalized to expression levels of Histone H3 in each corresponding lane.

## Monocyte Isolation and Co-culture With ADSC

Monocytes were obtained from 6 healthy controls. All healthy controls were recruited from the Etablissement Français du Sang (Toulouse, France). Fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated and CD14<sup>+</sup> monocytes were purified using the MagniSort Human CD14<sup>+</sup> positive selection kit (Life technologies). Monocyte purity was assessed by flow cytometry using an anti-CD14-FITC antibody and was routinely >90%. Cells were cultured in 24-well plates at ( $0.5 \times 10^6$  cells/mL) and activated with LPS 20 ng/mL (PeproTech) and IFN-γ 25 ng/mL (Sigma-Aldrich) for 24 h.

To evaluate the effect of SF on the ability of ADSC to modulate macrophages, ADSC were plated in a 24-well plate and treated with either control SF or the different RASF for 24 h. Activated pro-inflammatory macrophages were washed and added the

following day to ADSC treated with different conditions at a ADSC:macrophages ratio of 1:5 for another 24 h.

## T Cell Isolation and Co-culture With ADSC

CD4<sup>+</sup> T cells were obtained from 7 healthy controls. PBMC were isolated by BD density gradient centrifugation and subsequently frozen in liquid nitrogen. CD4<sup>+</sup> T cell were purified from frozen-thawed PBMC using the Magnisort Human CD4 T cell 2-step enrichment kit (Life Technologies) for positive magnetic separation. T cell purity was assessed by flow cytometry using an anti-CD4-FITC antibody (BD Biosciences). Cell purity was routinely >90%. T cells or PBMC were cultured in the presence or absence of ADSC at ADSC:T cells ratios of 1:40 and 1:5 and activated with beads coated with anti-CD3/CD28 for 72 h.

To evaluate the effect of SF on the ability of ADSC to modulate T cells, ADSC were plated in 96-well plates and stimulated for 24 h with SF control, RA1, or RA8 with or without anti-IL6R/anti-TNF or with the different RASF. The following day, adherent cells were washed with PBS and T cells were added at a ratio of 1:5 as previously described.

## Flow Cytometry Analysis

For intracellular cytokine detection, T cells were restimulated with PMA (50 ng/mL) and ionomycin (1 µg/mL, Sigma-Aldrich) in the presence of Brefeldin A (0.2%, BD Biosciences) for 4 h. Cells were then stained with antibodies against T cell markers or their respective isotype control anti-CD25-PECy7 and anti-CD4-FITC (BD Biosciences) for 20 min at 4°C in the dark, fixed, and permeabilized with the Transcription factor buffer set (BD Biosciences) and then stained intracellularly with anti-Foxp3-PE, anti-IFNγ-PE, and anti-IL17A-AF647 antibodies (BD Biosciences) for 30 min at 4°C for flow cytometry detection of Tregs, Th1, and Th17 cells, respectively.

For flow cytometric detection of macrophages, cells were stained with the following antibodies or their respective isotype controls anti-CD40-APCy7 (BioLegend), anti-CD80-BV421 (BioLegend), anti-CD16-V500 (BD Biosciences), anti-CD206-AF488 (BioLegend), anti-CD163-APC (Miltenyi Biotec) for 20 min at 4°C in the dark. All samples were acquired on a MACSQUANT Q10 cytometer (Miltenyi Biotec) and analyzed using FlowJo v7.6.5 software (Tree Star).

## Statistical Analysis

All results were expressed as mean ± SEM. After the Shapiro-Wilk normality test was performed, groups were compared using a Paired Student's *t*-test or Wilcoxon matched pairs test. To assess the correlation between concentrations of pro-inflammatory cytokines quantified in SF and ADSC gene expression, the data was square root-transformed (sqrt) to restore normal distribution and correlation was evaluated using the Pearson *r* correlation coefficient. RA4 TNF sqrt value was determined as an outlier and, taking into account the clinical particularity of this patient whose RA began as juvenile arthritis at a very young age (Table 1), it was excluded from correlation studies. Data were analyzed using GraphPad Prism v5.00 Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). *P* values <0.05 were considered as statistically significant.

**TABLE 1** | Characterization of SF based on patients' data.

	Age range	Age range at diagnosis	Treatment	DAS28-CRP	SF nucleated cell count (/mm <sup>3</sup> )	RF	ACPA	Erosion	Other
CTL									SF control from a patient undergoing non-inflammatory rheumatism-related surgery
SpA1	30–35	36–40	MTX		4,900			+	Spondyloarthritis
SpA2	66–70	Undetermined	Flurbiprofen		12,800				Psoriasis
RA1	60–65	50–55	Tocilizumab	5.77	15,200	+	+	+	
RA2	70–75	60–65	MTX, abatacept	6.58	8,250	+	+	+	
RA3	70–75	70–75	None	5.35	3,400	+	–	–	
RA4	26–30	0–5 (Juvenile arthritis)	MTX, etanercept	4.29	15,000	–	–	–	
RA5	76–80	40–45	MTX	3.84	4,000	+	–	+	
RA6	50–55	30–35	MTX, sulfasalazine, hydroxychloroquine	3.54	35,000	+	+	+	
RA7	80–85	60–65	None	4.26	9,500	+	+	+	
RA8	60–65	26–30	Prednisolone	3.89	19,400	+	–	–	

SF were obtained from eight different RA patients, two SpA patients and one control SF from a non-rheumatologic joint. CTL, control; SpA, spondyloarthritis; RA, rheumatoid arthritis; DAS28-CRP, Disease Activity Score 28 using C-reactive protein; RF, rheumatoid factor; ACPA, anti-citrullinated protein antibodies; MTX, methotrexate.

## RESULTS

### Characterization of SF Based on Patients' Data and Level of Inflammation

Clinical characteristics of patients and SF total nucleated cell counts are shown in **Table 1**. According to standard classification, SF is considered inflammatory when containing at least 2,000 cells/mm<sup>3</sup> (26). As such, all SF in our study (with the exception of SF control) were considered as inflammatory. However, for our translational approach, the inflammatory status of SF was further characterized based on patients laboratory test results, Disease Activity Score using C-reactive protein (DAS28-CRP) values, and an initial screening of 36 different cytokines using a cytokine-profiling array (**Figures 1A,B; Figure S1**). Amongst the detected cytokines, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-23, IL-12p70, IL-12p40, CCL17, CXCL10, IL-10, and IL-1RA were all quantified by LegendPlex Array, MCP-1 was measured by CBA and IL-6 by ELISA. RA1–7 were confirmed as highly pro-inflammatory synovial fluids with high levels of quantified pro-inflammatory cytokines. RA1 presented the most inflammatory profile with considerably higher concentrations of TNF, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-23, IL12p70, and MCP-1. RA8 was determined as the least inflammatory RASF as it contained extremely low levels of TNF, IL-1 $\beta$ , IL-23p70 combined (**Figure 1C**). SF control was considered as a low-grade inflammatory negative control and SpA1, SpA2 as non-rheumatoid inflammatory controls with very low concentrations of TNF, IL-6, IL-1 $\beta$ , and MCP-1 detected in synovial fluids (**Figure 1C**). IFN- $\gamma$  levels were undetected in all SF samples, as reported (31) which leads to believe that its role might not be prominent in the articular microenvironment and was thus not considered for the rest of the study (data not shown) (31).

### ADSC Phenotype Is Not Altered by SF

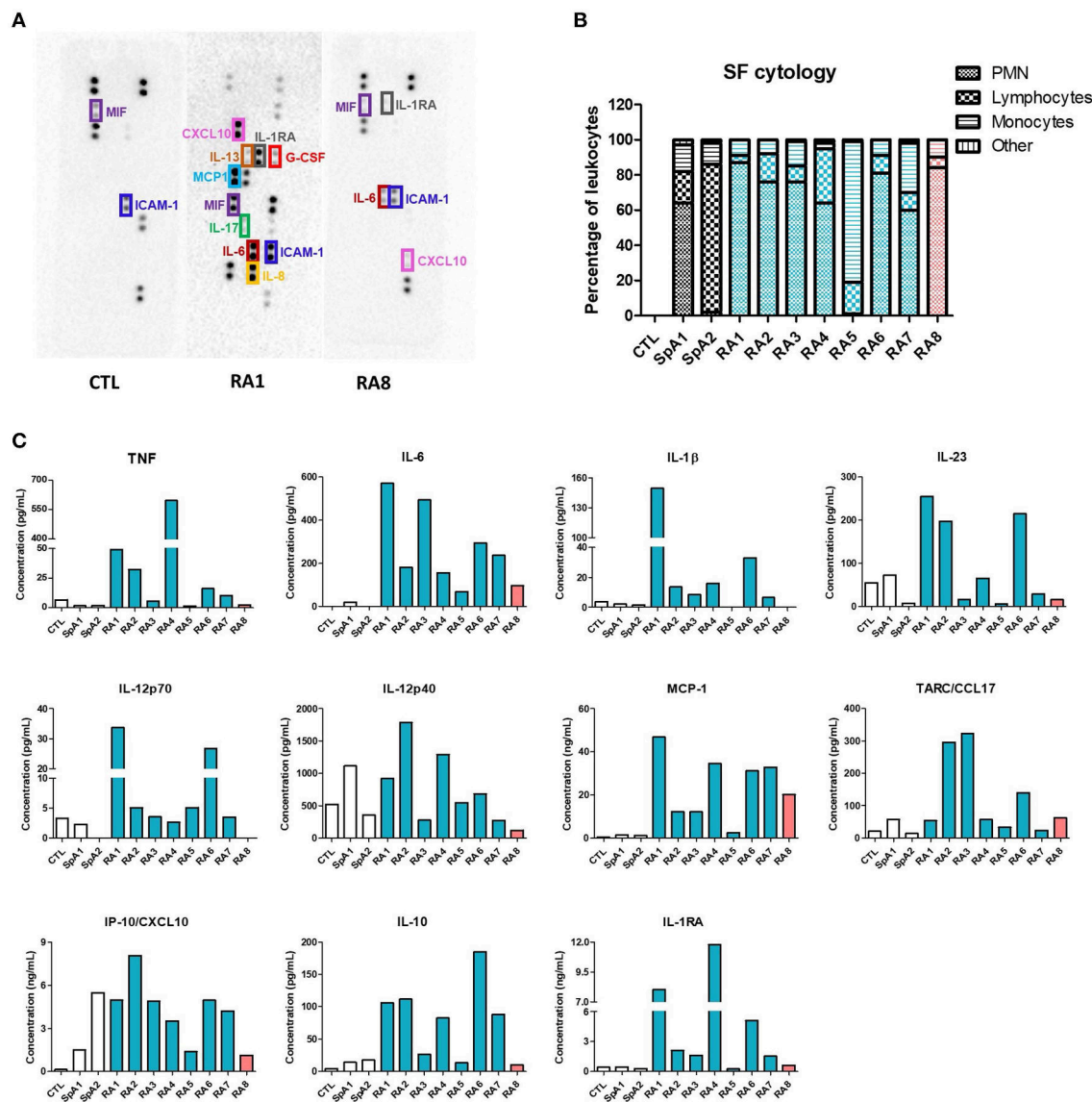
ADSC were able to differentiate into osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes and were shown to be positive for CD90, CD105, CD73, CD29 and negative for CD44, CD45, CD34, and HLA-DR (**Figure S2**). In order to evaluate whether the phenotype of ADSC could be modulated by the different SF, ADSC were cultured in the presence of 5% SF for 24 h and the cellular expression of ADSC markers was assessed by flow cytometry. None of the SF treatments affected the expression of CD90, CD105, CD73, CD44, CD45, CD34, and HLA-DR suggesting that ADSC immune-evasive phenotype is not altered by SF (**Figure S3**).

### SF Differentially Affect ADSC Proliferation

We next studied the effect of SF on ADSC proliferation. First, we determined the optimal concentration to use by culturing ADSC in the presence of 5, 25, or 50% SF for 48 h. All concentrations had a similar effect on ADSC proliferation (**Figure 2A**) thus a 5% concentration was used for all subsequent experiments. SF maintained ADSC's proliferative properties. Only 2 pro-inflammatory RASF RA1 and RA2 slightly but significantly induced ADSC proliferation whilst the remaining had no inhibitory effect (**Figure 2B**).

### SF Differentially Affect ADSC Gene Expression

To assess the effect of SF on the expression of genes implicated in the immunomodulatory and immune-suppressive ability of ADSC, cells were cultured in the presence of either control, SpA, or RASF for 24 h. SpA SF slightly induced the expression of only COX2 and TGF- $\beta$  compared to SF control (**Figure 2C**). On the other hand, pro-inflammatory RASF all significantly induced the expression of genes implicated in ADSC potential

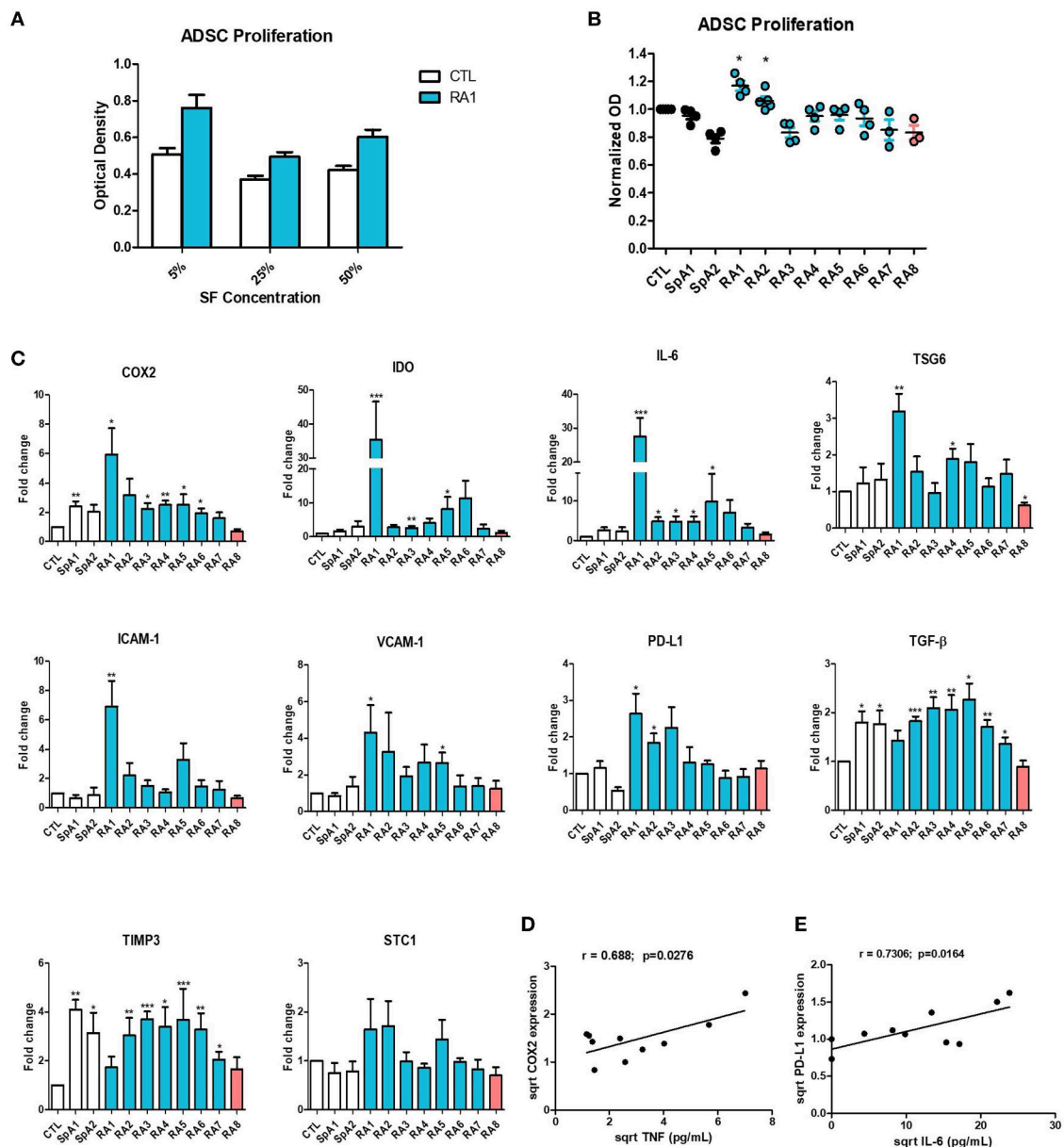


**FIGURE 1 |** Evaluation of synovial fluids inflammatory status. SF were obtained from 8 different RA patients, 2 SpA patients and one control SF from a non-rheumatologic joint. RASF are listed depending on their inflammatory status (blue being very pro-inflammatory, orange slightly inflammatory). **(A)** Pro-inflammatory mediators were identified using an antibody-based membrane array in CTL, RA1, RA8 synovial fluids. Black spots on membrane represent each a cytokine and are semi-quantified in duplicates. Upper and lower rows represent reference spots. **(B)** SF cytology was determined after routine laboratory analysis. **(C)** TNF, IL-1 $\beta$ , IL-23, IL-12p70, IL-12p40, MCP-1, CCL17, CXCL10, IL-10, and IL-1RA were quantified in each SF by LegendPlex, MCP-1 was measured by Cytometric Bead Array and IL-6 by ELISA.

albeit to different extents. RA1, the most pro-inflammatory RASF, enhanced very potently the expression of COX2, IDO, IL-6, TSG-6, ICAM-1, VCAM-1, PD-L1, and TGF- $\beta$  compared to control (up to 35-fold change) whereas RA2–RA7 induced more modestly their gene expression (up to 11-fold change). However, RA8 which was considered as the least inflammatory statistically inhibited the expression of TSG-6 and had a trend toward the inhibition of COX2, IDO, IL-6, ICAM-1, VCAM-1, PD-L1, and TGF- $\beta$ . Other genes not directly implicated in ADSC immunomodulatory potential such as TIMP-3 and STC-1

were not differentially modulated by the different SF and were used as controls for the rest of the study (**Figure 2C**). SF effect on IL-6 and TIMP3 gene expression was confirmed by their quantification in ADSC culture supernatants (**Figure S4**). The enhanced expression of immunomodulatory genes by ADSC thus seems to be dependent on the pro-inflammatory profile of RASF. This was further confirmed by a significant correlation between TNF concentrations and COX-2 (**Figure 2D**), TSG6, VCAM-1, PD-L1 gene expression (**Figure S5**) and between IL-6 concentrations and PD-L1 expression (**Figure 2E**). We had a





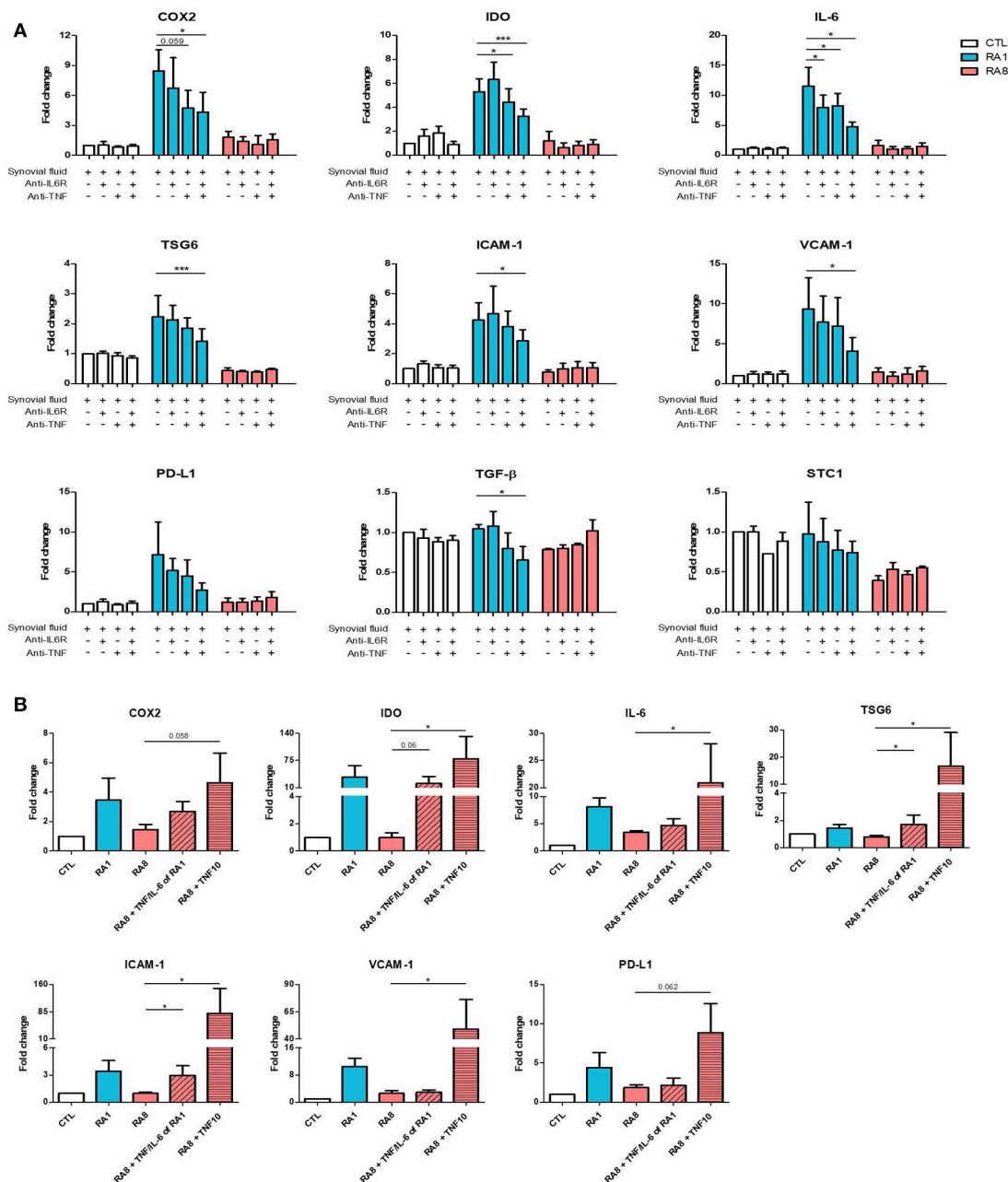
**FIGURE 2 |** Differential effect of synovial fluids on ADSC proliferation and gene expression. **(A)** ADSC were cultured for 48 h in the presence of increasing concentrations of SF Control and RA1 at 5, 25, and 50% ( $n = 3$ ). **(B)** For the remaining experiments, ADSC were cultured in the presence of 5% SF for 48 h from either RA, SpA, or control patients ( $n = 3 - 6$ ). ADSC proliferation was assessed using a colorimetric MTT proliferation assay. **(C)** ADSC were cultured for 24 h in the presence of SF from either RA, SpA, or control patients. COX2, IDO, IL-6, TSG6, ICAM-1, VCAM-1, PD-L1, TGF- $\beta$ , TIMP3, and STC-1 gene expression was evaluated by quantitative RT-PCR. RNA levels were normalized to RPS9 ( $n = 5$ ). Results are represented as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . **(D,E)** Correlation (Pearson) between **(D)** TNF concentrations and COX-2 gene expression and **(E)** IL-6 concentrations and PD-L1 gene expression. Data are square root-transformed.

trend toward correlation with the rest of the aforementioned genes though not statistically significant due to the low number of samples (Figure S5).

## RASF-Induced Gene Expression in ADSC Is Mediated by TNF

Having previously detected TNF and IL-6 in RASF (Figure 1C), we investigated whether blocking these cytokines with

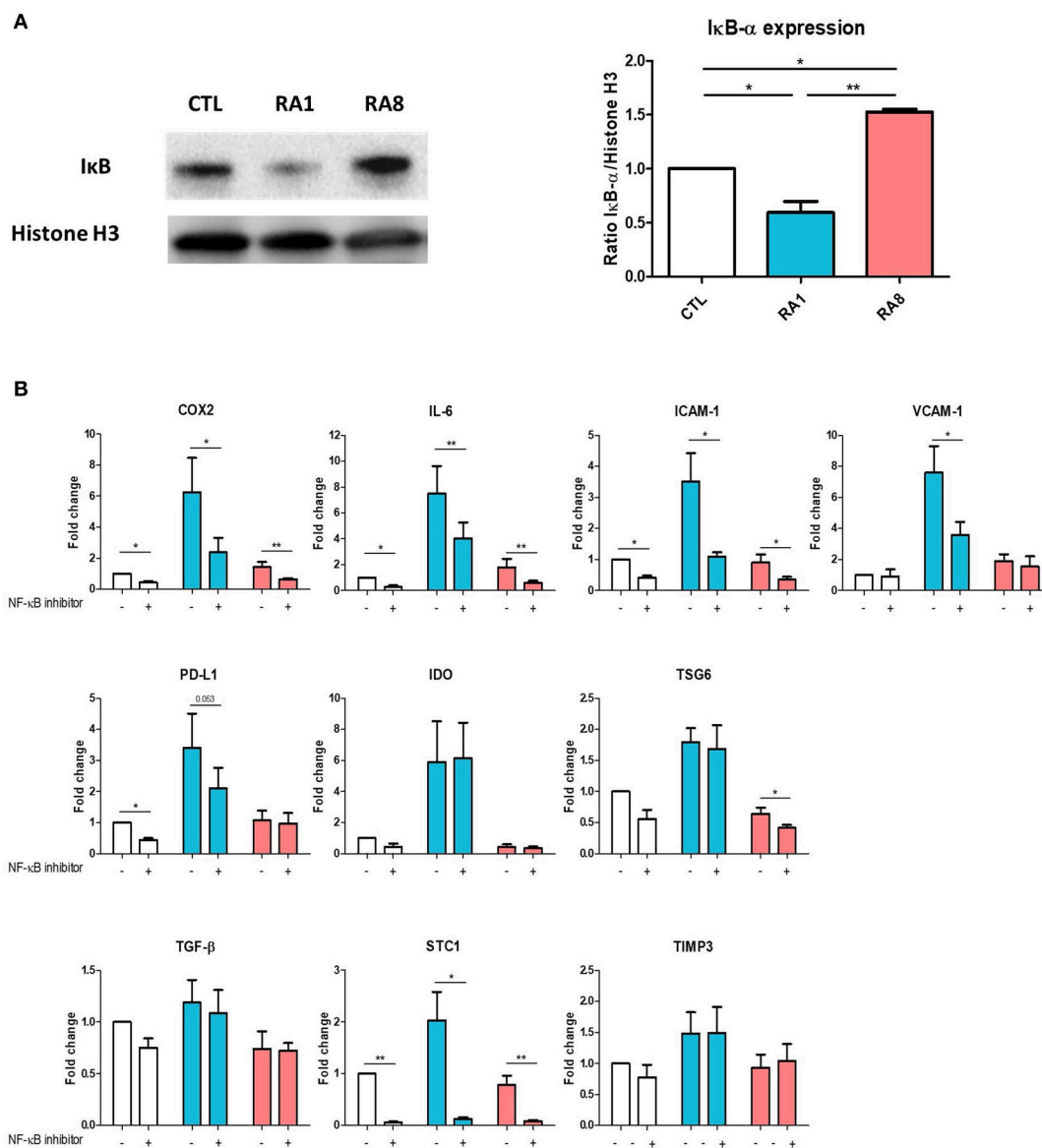
neutralizing antibodies alone or in combination could inhibit RASF-induced gene expression in ADSC. To perform these experiments, three different SF were selected: SF control, RA1 as a pro-inflammatory inducer of ADSC immunomodulatory properties and RA8 as a low-inflammatory inhibitor. ADSC were cultured for 24 h in the presence of SF with or without anti-IL6R and/or anti-TNF. TNF and IL-6 neutralization alone in RA1 inhibited the induction of gene expression although it was not



**FIGURE 3 |** TNF mediates the enhancing effect of pro-inflammatory RASF on ADSC gene expression. ADSC were cultured for 24 h in the presence of SF CTL, RA1, or RA8 with or without anti-IL6R and/or anti-TNF (A) and SF CTL, RA1, and RA8 alone or in the presence of IL-6 (570 pg/ml) and TNF (50 pg/ml) as found in RA1 or TNF (10 ng/ml) (B). COX2, IDO, IL-6, TSG6, ICAM-1, VCAM-1, PD-L1, TGF-β, TIMP3, and STC-1 gene expression was evaluated by quantitative RT-PCR. RNA levels were normalized to RPS9. Results are represented as mean ± SEM of at least 4 independent experiments. \**p* < 0.05; \*\*\**p* < 0.001.

statistically significant due to donor variability (Figure 3A). A simultaneous neutralization of TNF and IL-6 in RA1 but not in control or RA8 resulted in an additive and significant inhibitory effect on ADSC gene expression (Figure 3A). We thus speculated that the presence of TNF and IL-6 in SF could be pivotal for the induction of ADSC potential. To further clarify the role of IL-6 and TNF, ADSC were treated with RA8 alone or in the presence of recombinant IL-6 (570 pg/mL) and TNF (50

pg/mL) as found in RA1 or in the presence of recombinant TNF at a concentration of 10 ng/mL. Mirroring data on inhibition, adding recombinant TNF (10 ng/mL) to RA8 as a positive control significantly induced the expression of IDO, IL-6, TSG-6, ICAM-1, VCAM-1. COX2 and PD-L1 gene expression was also induced although not significantly. On the other hand, adding IL-6 and TNF to RA8 at the same concentrations detected in RA1 partly overcame its suppressive effect on



**FIGURE 4 |** The effect of pro-inflammatory RASF partly signals through NF-κB. **(A)** ADSC were cultured for 6 h in the presence of SF CTL, RA1, or RA8. IκB expression was assessed by western blot. Histone H3 was used as control. **(B)** ADSC were pretreated with either vehicle or caffeic acid phenethyl ester CAPE (20 μM) for 2 h and then cultured for 24 h in the presence of SF CTL, RA1 or RA8. COX2, IDO, IL-6, TSG6, ICAM-1, VCAM-1, PD-L1, TGF-β, TIMP3, and STC-1 gene expression was evaluated by quantitative RT-PCR. RNA levels were normalized to RPS9. Results are represented as mean ± SEM of 3 independent experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

ADSC as shown by the induction of COX2, IDO, TSG6, and ICAM-1 (Figure 3B).

## RASF Modulates NF-κB Signaling Pathway in ADSC

Because TNF plays an important role in activating the NF-κB signaling pathway, we first examined whether stimulating ADSC with the different SF could induce the expression of IκB which is inversely correlated with NF-κB activation. ADSC were

treated for 6 h with SF control, RA1 and RA8. The expression of IκB was significantly inhibited in ADSC stimulated with RA1 compared to SF control suggesting an activation of NF-κB pathway. Conversely, RA8 significantly induced the expression of IκB indicating an inhibition of NF-κB (Figure 4A). To confirm the involvement of NF-κB in RA1-induced gene expression, we pre-treated the cells with the inhibitor of NF-κB activation CAPE prior to SF stimulation. We showed that by specifically inhibiting NF-κB activation, the effect of RA1 but not control or RA8 was statistically reversed. The induction of COX2, IL-6, ICAM-1,

VCAM-1, PD-L1, and STC1 by RA1 was inhibited whereas IDO, TSG6, TGF- $\beta$ , and TIMP3 gene transcripts remained unchanged (**Figure 4B**).

### Conditioning ADSC With RASF Influences Their Capacity to Inhibit Pro-inflammatory Markers in Macrophages

We first validated the effect of ADSC on the modulation of macrophages pro-inflammatory markers. To that aim, we chose to study the cellular expression of CD40 and CD80 as pro-inflammatory markers, as described (32). Monocytes were first activated with LPS and IFN- $\gamma$  for 24 h to skew them toward a pro-inflammatory phenotype and then added to ADSC at an ADSC:macrophages ratio of 1:5. In the co-culture setting, ADSC inhibited the expression of pro-inflammatory markers CD40 and CD80 in macrophages (**Figures 5A,B**). We thus evaluated whether stimulating ADSC with SF control, RA1, or RA8 for 24 h could affect their capacity to modulate these markers. ADSC conditioned with RA1 inhibited more potently the expression of CD40 and CD80 whereas ADSC conditioned with RA8 were less effective (**Figures 5A,B**). Similarly, all ADSC conditioned with RA2–RA7 significantly inhibited CD40 expression compared to control and to a lesser extent CD80 with RA1 being the most efficient in accordance with its superior effect on ADSC gene expression in **Figure 2** and **Figures S6A,B**. These results indicate that RASF affects the capacity of ADSC to modulate pro-inflammatory macrophage markers. In parallel, ADSC did not affect the expression of alternative markers CD16, CD206, and CD164 (**Figures 5C–E**).

### Conditioning ADSC With RASF Affects Their Ability to Induce Tregs

To examine the immunomodulatory effect of ADSC on different T cell subsets, purified CD4<sup>+</sup> T cells were activated with beads coated with anti-CD3/CD28 at ADSC:T cells ratios of 1:40 and 1:5 for 3 days. At both ratios, ADSC significantly increased the percentage of Tregs and inhibited Th1 cells as detected by the expression of CD4, CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> cells and IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells, respectively (**Figures 6A,B**). ADSC did not have a particular effect on IL-17 producing cells (data not shown). These results were in accordance with an increase in T cell viability in the presence of ADSC (data not shown). We then investigated whether SF could functionally affect the ability of ADSC to modulate T cell subsets. ADSC were stimulated for 24 h with SF control, RA1, or RA8 with or without anti-IL6R and anti-TNF prior to the addition of T cells at a 1:5 ratio. As observed in the effect of SF on ADSC gene expression, ADSC conditioned with RA1 induced more potently Tregs compared to SF CTL whereas ADSC conditioned with RA8 were significantly less effective in the induction of Tregs. Furthermore, the enhancing effect of RA1 was abrogated in the presence of the neutralizing antibodies (**Figure 6C**). These results were confirmed in co-culture experiments with PBMC as well (**Figure S7**). In addition to RA1, ADSC conditioned with pro-inflammatory RA2 through RA7 were more efficient in inducing Tregs compared to control (**Figure S8**). This suggests that RASF differentially modulate the

ability of ADSC to induce Tregs and that this effect is directly correlated to the presence of IL-6 and TNF in SF. We next assessed whether RASF could influence the effect of ADSC on Th1 cells. ADSC conditioned with RA1 did not enhance their ability to inhibit Th1 cells. However, ADSC conditioned with RA8 inhibited Th1 cells to a lesser extent though not statistically significant (**Figure 6D**).

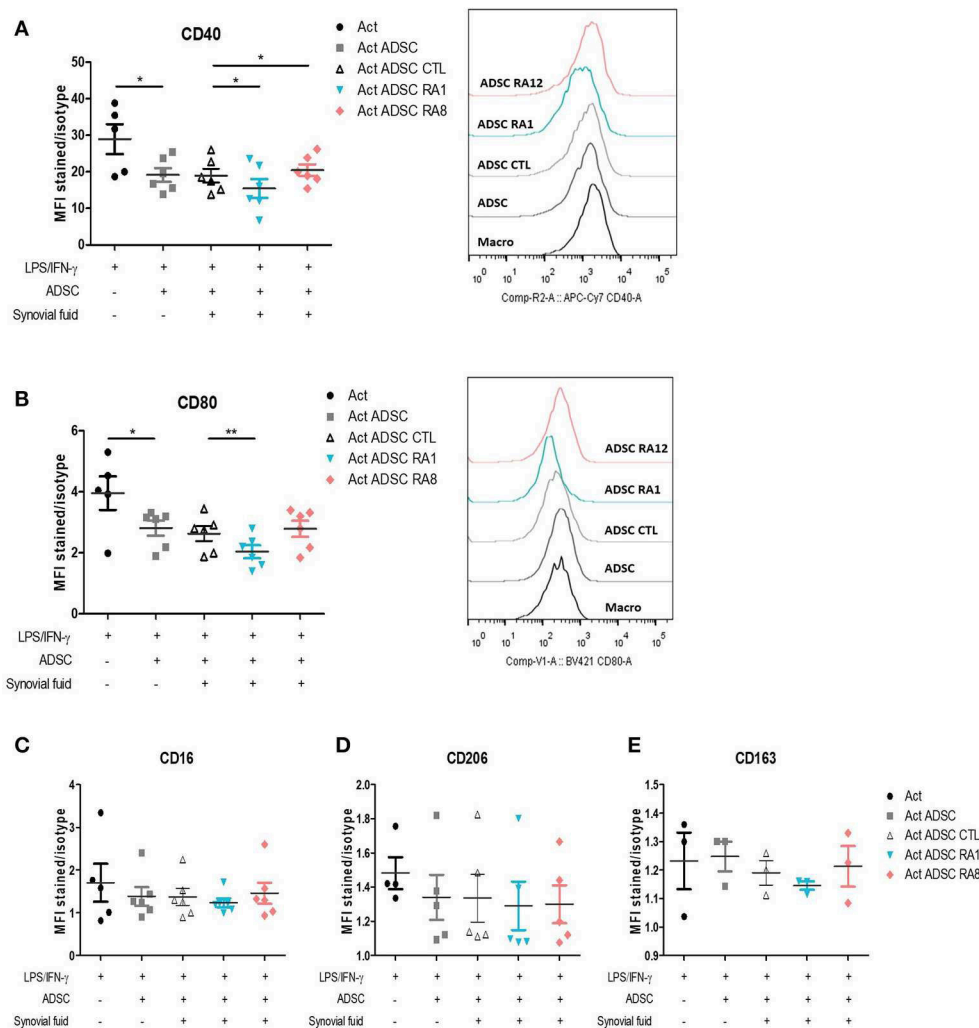
## DISCUSSION

In this study, we demonstrate that the immunomodulatory efficiency of ADSC is highly dependent on the cytokine/articular microenvironment in which they are present. Pro-inflammatory synovial fluids maintain the proliferation of ADSC and upregulate the expression of genes involved in their immunomodulatory potential through an TNF/NF- $\kappa$ B dependent mechanism. Furthermore, this study shows that ADSC exposed to a pro-inflammatory SF are more effective in inducing regulatory T cells and inhibiting pro-inflammatory macrophages compared to control SF.

Although ADSC are considered immune-evasive, it has been reported that they could upregulate their expression of MHC-II when treated with IFN- $\gamma$  (33). Here, we show that none of the ADSC defining markers are altered when treated with SF including HLA-DR. Our results reveal that ADSC maintain their immune-evasive properties even when exposed to SF and would not be rejected when injected into the articular microenvironment. We demonstrate as well that rheumatoid synovial fluids do not inhibit ADSC proliferation with 2 out of 8 even inducing proliferation. Maintaining ADSC proliferative properties is essential in order to maximize their effect in the local joint environment.

It has been previously demonstrated that the therapeutic ability of mesenchymal stem cells varies depending on the local environment they encounter (34). Rheumatoid synovial fluids reportedly contain high levels of pro-inflammatory cytokines (26) which suggests their potential role in ADSC immunomodulation. Our findings on the induction of immunomodulatory factors by inflammatory RASF lead to believe that RASF could indeed push ADSC potential forward. More specifically, IDO, PGE2, and IL-6 all play key roles in ADSC effects on the proliferation, phenotype and function of T lymphocytes and macrophages as blocking either one of these molecules mitigated ADSC-mediated immunomodulation (12, 15). Furthermore, ICAM-1, V-CAM1, and PD-L1, which were increased as well, are all involved in mediating the anchoring of T cells to ADSC and their subsequent functional inhibition whereas TSG6 is more implicated in skewing macrophages toward an anti-inflammatory phenotype (16, 35). These results are in accordance with a study by Leijts et al. that reported higher mRNA expression of IDO in MSC conditioned with RASF compared to control (36). Overall, RA1 which stood out as the most inflammatory appears as the prototypical SF capable of enhancing ADSC properties. This was further confirmed by the strong relationship found between SF content of TNF and IL-6 and the induction of





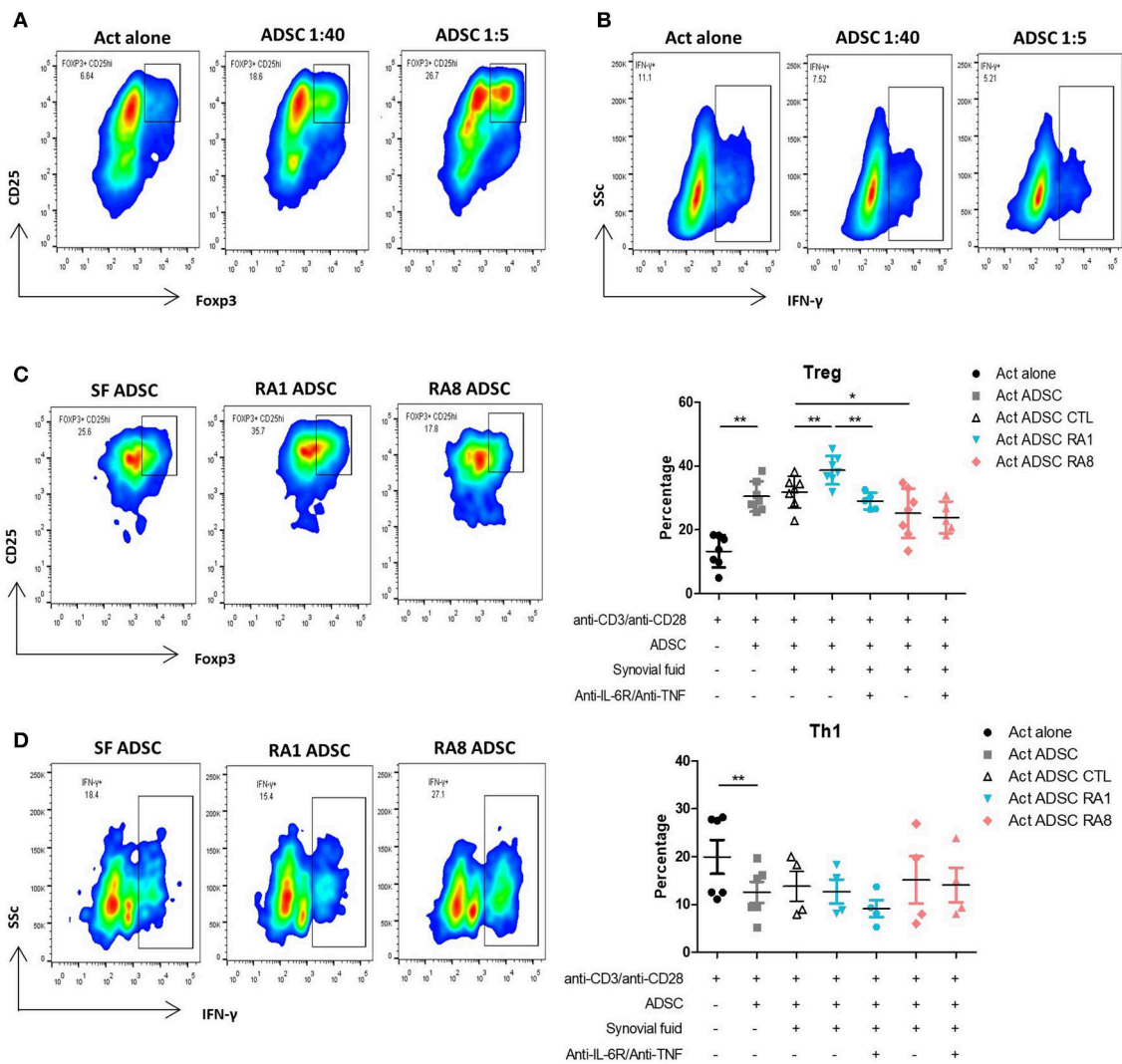
**FIGURE 5 |** Conditioning ADSC with pro-inflammatory RASF enhances their ability to inhibit pro-inflammatory markers in macrophages. **(A–E)** ADSC were plated in 48-well plates and stimulated for 24 h with SF control, RA1, or RA12. The next day, macrophages from healthy donors were added to ADSC for 24 h following a 24-h activation with LPS/IFN- $\gamma$ . Cells were then harvested and stained with anti-CD40 **(A)** and anti-CD80 **(B)** antibodies for flow cytometry detection of pro-inflammatory markers and anti-CD16 **(C)**, anti-CD206 **(D)**, anti-CD163 **(E)** for flow cytometry detection of alternative markers. Results are represented as mean  $\pm$  SEM of 3–6 independent experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

ADSC gene expression. High concentrations of TNF and IL-6 could thus be a basis for prediction of ADSC efficiency within the synovial joint. However, specific characteristics of SF that could predict their effect on ADSC still need to be more precisely defined.

On the other hand, it is important to highlight that only one rheumatoid synovial fluid RA8 did not contain high levels of pro-inflammatory molecules and that this particular RASF inhibited the expression of COX2, IDO, and TSG6. Insufficient concentrations of pro-inflammatory cytokines could thus abolish the immunomodulatory effects of ADSC.

One of the pro-inflammatory cytokines known to elicit the immunosuppressive function of ADSC and MSC from different sources is TNF (37, 38). It has indeed been shown that IFN- $\gamma$  along with TNF could regulate MSC efficiency although this is

limited to the concentrations used and duration of exposure (38). Having not detected IFN- $\gamma$  in RASF, we evaluated whether or not TNF alone or in combination with IL-6 could dictate the immunomodulatory potential of ADSC. Here, we show that the presence of TNF and IL-6 in SF is essential to enhance ADSC immunoregulatory response as shown by either neutralizing TNF and IL-6 in pro-inflammatory RASF or adding recombinant IL-6 and TNF to the lesser inflammatory RASF in order to mimic a pro-inflammatory environment. Although TNF was shown to be the most critical, IL-6 seems to play a role as well in enhancing ADSC functionality but only when in combination with TNF. Our data suggest that although IL-6 and TNF play an essential role in the enhancing effect of RA1 on ADSC gene expression, other pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  could be contributing to its effect as well.

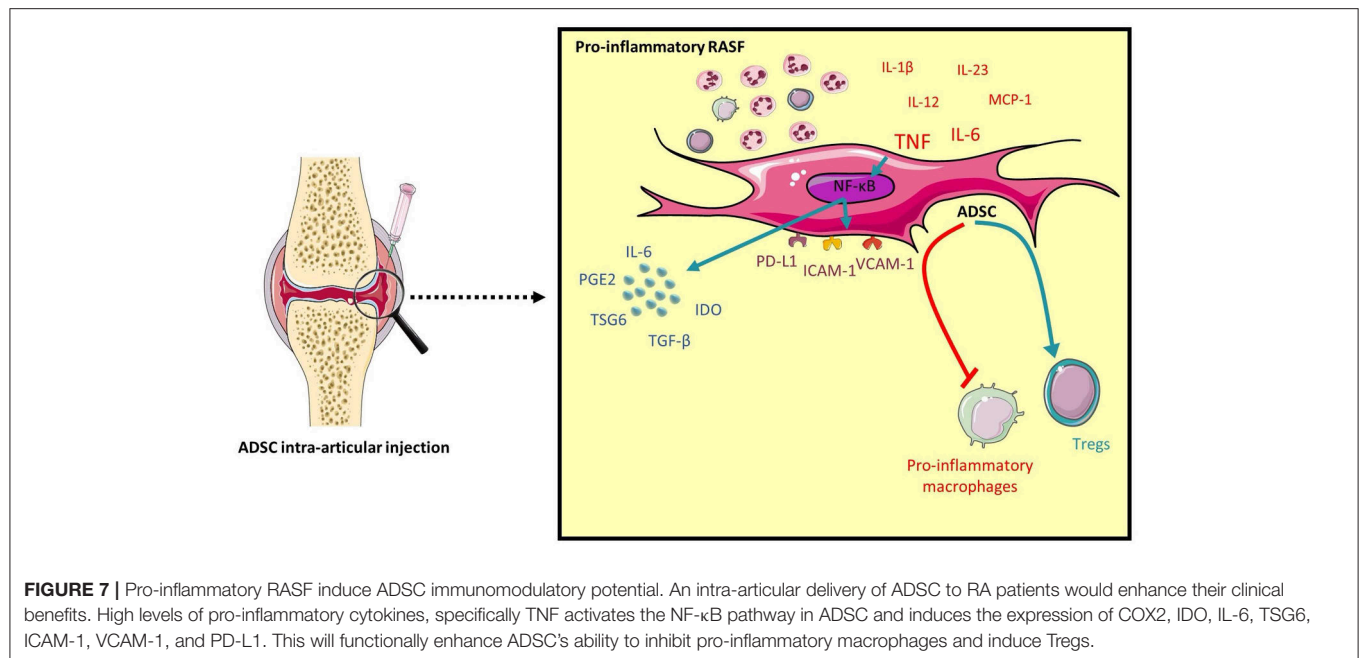


**FIGURE 6 |** Conditioning ADSC with pro-inflammatory RASF enhances their ability to induce Tregs but not inhibit Th1. T cells from healthy donors were cultured in the presence or absence of ADSC at 1:40 and 1:5 ratios and activated with beads coated with anti-CD3/CD28 for 72 h. Cells were then harvested and stained with anti-CD25 and anti-Foxp3 antibodies for flow cytometry detection of Tregs (representative of 7 independent experiments) (A) or anti-IFN $\gamma$  antibodies for flow cytometry detection of Th1 (representative of 6 independent experiments) (B). (C,D) ADSC were plated in 96-well plates and stimulated for 24 h with SF control, RA1, or RA12 with or without anti-IL6R and anti-TNF. The following day, ADSC were washed and T cells were added to ADSC at a ratio of 1:5 and activated with beads coated with anti-CD3/CD28 for 72 h. Cells were harvested and Tregs (C) or Th1 (D) percentages were detected by flow cytometry. Results are represented as mean  $\pm$  SEM of 4–7 independent experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

Moreover, we demonstrate that the enhancement of ADSC potential signals through the NF- $\kappa$ B pathway as shown by the inhibition of I $\kappa$ B expression in ADSC after stimulation with pro-inflammatory RASF. Our finding was confirmed by the selective inhibition NF- $\kappa$ B activation in ADSC. These results are consistent with studies done by Dorronsoro et al. which reveals the importance of TNF-mediated activation of NF- $\kappa$ B for priming the immunosuppressive function in MSC (8) and by Luz-Crawford et al. that demonstrated that MSC deficient for peroxisome proliferator-activated receptor which is known to inhibit NF- $\kappa$ B signaling pathways have enhanced immunosuppressive properties (39). Our finding thus reveals the importance of the TNF/NF- $\kappa$ B axis in priming ADSC.

IDO and TSG6 levels were not affected by the inhibition of NF- $\kappa$ B. The effect of TNF is thus not limited to NF- $\kappa$ B but crosstalks with other pathways as well. IDO secretion has been reported to be also dependent on the JAK/STAT signaling pathway (40). Regarding TSG6, a study by Wang et al. showed regulation by IDO through its metabolite kynurenic acid which activates the aryl hydrocarbon receptor (AhR) that binds to the promoter of TSG6 and enhances its expression (41).

ADSC have been shown to modulate T cell responses by generating regulatory T cells and inhibiting Th1 and Th17 cells (19, 42). In line with our results regarding a differential regulation of ADSC gene expression by SF, here we demonstrate that conditioning ADSC with pro-inflammatory RASF functionally



enhances their ability to induce regulatory T cells compared to control SF due to the presence of TNF in RASF. In contrast, ADSC conditioned with lesser inflammatory RASF are less efficient in inducing Tregs. Similarly to their effects on T cells, priming ADSC with pro-inflammatory RASF functionally results in a more potent inhibition of the pro-inflammatory markers CD40 and CD80 on activated macrophages with no effect on alternative M2 markers. This could be explained by the relatively short time period of ADSC:macrophages co-culture to induce their expression. Altogether, our finding shows that ADSC exposed to a pro-inflammatory RASF exhibits a much stronger immunoregulatory response (**Figure 7**).

Overall, this study is the first to show that the proinflammatory environment of rheumatoid synovial fluids plays an essential role in orchestrating the immunomodulatory potential of ADSC. This opens the door for the consideration of the physiological levels of TNF and, for the first time, IL-6 when studying ADSC immunomodulatory plasticity in a clinical setting. Quantifying TNF and IL-6 in the articular joint prior to ADSC administration could indeed help predict their therapeutic outcome.

## CONCLUSION

In conclusion, our results suggest that the use of ADSC as a therapeutic strategy should take into account the influence of the local joint environment on their potential. Licensing of ADSC by an intra-articular delivery to inflamed joints would maximize their clinical benefits in the treatment of RA. However, a better understanding of mechanisms that regulate the immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells remains of pivotal importance for ameliorating MSC-based therapies.

## DATA AVAILABILITY

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

## ETHICS STATEMENT

The use of ADSC in this study was approved by the Université Saint-Joseph ethics committee (CEHDE 733). The SF study protocol was approved by the CHU Toulouse ethics committee (BioTOUL DC 2016-2804).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

SS designed the study, performed experimental work, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. NA and J-LD designed the study, interpreted the data, and critically revised the manuscript. EC, ArC, and AIC provided SF samples. OE and KD performed experimental work. BR, YD, and VT-S interpreted the data. All authors read and approved the final manuscript.

## FUNDING

This work was supported by grants from INSERM CNRS and Agence Universitaire de la Francophonie.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Valérie Planat-Bénard and Danièle Noël for providing us with ADSC for some experiments. We thank

Michel Baron for technical help. We thank Fatima-Ezzahra L'Faqihi, Anne-Laure Iscache, Valérie Duplan-Eche, and Paul Menut for technical assistance at CPTP-UMR 1043 flow cytometry core facility. We thank Charbel Khalil for technical assistance.

## REFERENCES

- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* (2007) 100:1249–60. doi: 10.1161/01.RES.0000265074.83288.09
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* (2005) 7:393–5. doi: 10.1080/14653240500319234
- Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells: the great WAT hope. *Trends Endocrinol Metab.* (2012) 23:270–7. doi: 10.1016/j.tem.2012.01.003
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* (2006) 8:315–7. doi: 10.1080/14653240600855905
- Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, et al. Mesenchymal stem cells: mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant.* (2010) 19:667–79. doi: 10.3727/096368910X508762
- Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell.* (2008) 2:141–50. doi: 10.1016/j.stem.2007.11.014
- Li W, Ren G, Huang Y, Su J, Han Y, Li J, et al. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ.* (2012) 19:1505–13. doi: 10.1038/cdd.2012.26
- Dorronsoro A, Ferrin I, Salcedo JM, Jakobsson E, Fernández-Rueda J, Lang V, et al. Human mesenchymal stromal cells modulate T-cell responses through TNF- $\alpha$ -mediated activation of NF- $\kappa$ B. *Eur J Immunol.* (2014) 44:480–8. doi: 10.1002/eji.201343668
- Rozenberg A, Rezk A, Boivin M-N, Darlington PJ, Nyirenda M, Li R, et al. Human mesenchymal stem cells impact Th17 and Th1 responses through a prostaglandin E2 and myeloid-dependent mechanism. *Stem Cells Transl Med.* (2016) 5:1506–14. doi: 10.5966/sctm.2015-0243
- Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Sánchez-Abarca LI, Blanco B, López A, et al. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica.* (2008) 93:1301–9. doi: 10.3324/haematol.12857
- Cho D-I, Kim MR, Jeong H, Jeong HC, Jeong MH, Yoon SH, et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp Mol Med.* (2014) 46:e70. doi: 10.1038/emm.2013.135
- Djouad F, Charbonnier L-M, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells.* (2007) 25:2025–32. doi: 10.1634/stemcells.2006-0548
- Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood.* (2008) 111:1327–33. doi: 10.1182/blood-2007-02-074997
- Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol.* (2010) 184:2321–8. doi: 10.4049/jimmunol.0902023
- Tipnis S, Viswanathan C, Majumdar AS. Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. *Immunol Cell Biol.* (2010) 88:795–806. doi: 10.1038/icb.2010.47
- Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* (2014) 21:216–25. doi: 10.1038/cdd.2013.158
- Lin L, Du L. The role of secreted factors in stem cells-mediated immune regulation. *Cell Immunol.* (2018) 326:24–32. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.07.010
- Liu Y, Mu R, Wang S, Long L, Liu X, Li R, et al. Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* (2010) 12:R210. doi: 10.1186/ar3187
- Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Varela N, O'Valle F, Hernandez-Cortes P, Rico L, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells *in vitro* in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* (2010) 69:241–8. doi: 10.1136/ard.2008.101881
- González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* (2009) 60:1006–19. doi: 10.1002/art.24405
- Kehoe O, Cartwright A, Askari A, El Haj AJ, Middleton J. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells leads to reduced inflammation and cartilage damage in murine antigen-induced arthritis. *J Transl Med.* (2014) 12:157. doi: 10.1186/1479-5876-12-157
- Álvarez-Gracia JM, Jover JA, García-Vicuña R, Carreño L, Alonso A, Marsal S, et al. Intravenous administration of expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in refractory rheumatoid arthritis (Cx611): results of a multicentre, dose escalation, randomised, single-blind, placebo-controlled phase Ib/IIa clinical trial. *Ann Rheum Dis.* (2017) 76:196–202. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208918
- Shadmanfar S, Labibzadeh N, Emadodin M, Jaroughi N, Azimian V, Mardpour S, et al. Intra-articular knee implantation of autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in rheumatoid arthritis patients with knee involvement: results of a randomized, triple-blind, placebo-controlled phase 1/2 clinical trial. *Cytotherapy.* (2018) 20:499–506. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.12.009
- Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity.* (2017) 46:183–96. doi: 10.1016/j.immuni.2017.02.006
- Smolen JS, Aletaha D, Redlich K. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data? *Nat Rev Rheumatol.* (2012) 8:235–43. doi: 10.1038/nrrheum.2012.23
- Hui AY, McCarty WJ, Masuda K, Firestein GS, Sah RL. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* (2012) 4:15–37. doi: 10.1002/wsbm.157
- Bhattacharjee M, Balakrishnan L, Renuse S, Advani J, Goel R, Sathe G, et al. Synovial fluid proteome in rheumatoid arthritis. *Clin Proteomics.* (2016) 13:12. doi: 10.1186/s12014-016-9113-1
- Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Nishitani K, Ito H, et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* (2010) 12:R86. doi: 10.1186/ar3013
- Mohamed-Ahmed S, Fristad I, Lie SA, Suliman S, Mustafa K, Vindenes H, et al. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Res Ther.* (2018) 9:168. doi: 10.1186/s13287-018-0914-1
- El Atat O, Antonios D, Hilal G, Hokayem N, Abou-Ghoch J, Hashim H, et al. An evaluation of the stemness, paracrine, and tumorigenic characteristics of highly expanded, minimally passaged adipose-derived stem cells. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0162332. doi: 10.1371/journal.pone.0162332

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01482/full#supplementary-material>

31. Gómez-Puerta JA, Celis R, Hernández MV, Ruiz-Esqueda V, Ramírez J, Haro I, et al. Differences in synovial fluid cytokine levels but not in synovial tissue cell infiltrate between anti-citrullinated peptide/protein antibody-positive and -negative rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther.* (2013) 15:R182. doi: 10.1186/ar4372
32. Degboé Y, Rauwel B, Baron M, Boyer J-F, Ruysen-Witrand A, Constantin A, et al. Polarization of rheumatoid macrophages by TNF targeting through an IL-10/STAT3 mechanism. *Front Immunol.* (2019) 10:3. doi: 10.3389/fimmu.2019.00003
33. Chan JL, Tang KC, Patel AP, Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM, et al. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood.* (2006) 107:4817–24. doi: 10.1182/blood-2006-01-0057
34. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switches of inflammation. *Cell Stem Cell.* (2013) 13:392–402. doi: 10.1016/j.stem.2013.09.006
35. Song W-J, Li Q, Ryu M-O, Ahn J-O, Ha Bhang D, Chan Jung Y, et al. TSG-6 secreted by human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorates DSS-induced colitis by inducing M2 macrophage polarization in mice. *Sci Rep.* (2017) 7:5187. doi: 10.1038/s41598-017-04766-7
36. Leijts MJC, van Buul GM, Lubberts E, Bos PK, Verhaar JAN, Hoogduijn MJ, et al. Effect of arthritic synovial fluids on the expression of immunomodulatory factors by mesenchymal stem cells: an explorative *in vitro* study. *Front Immunol.* (2012) 3:231. doi: 10.3389/fimmu.2012.00231
37. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol.* (2014) 15:1009–16. doi: 10.1038/ni.3002
38. Yan L, Zheng D, Xu R-H. Critical role of tumor necrosis factor signaling in mesenchymal stem cell-based therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Front Immunol.* (2018) 9:1658. doi: 10.3389/fimmu.2018.01658
39. Luz-Crawford P, Ipseiz N, Espinosa-Carrasco G, Caicedo A, Tejedor G, Toupet K, et al. PPAR $\beta/\delta$  directs the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in arthritis. *Ann Rheumat Dis.* (2016) 75:2166–74. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208696
40. Campia I, Buondonno I, Castella B, Rolando B, Kopecka J, Gazzano E, et al. An autocrine cytokine/JAK/STAT-signaling induces kynurenine synthesis in multidrug resistant human cancer cells. *PLOS ONE.* (2015) 10:e0126159. doi: 10.1371/journal.pone.0126159
41. Wang G, Cao K, Liu K, Xue Y, Roberts AI, Li F, et al. Kynurenic acid, an IDO metabolite, controls TSG-6-mediated immunosuppression of human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* (2018) 25:1209–23. doi: 10.1038/s41418-017-0006-2
42. Luz-Crawford P, Kurte M, Bravo-Alegria J, Contreras R, Nova-Lamperti E, Tejedor G, et al. Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Res Ther.* (2013) 4:65. doi: 10.1186/scrt216

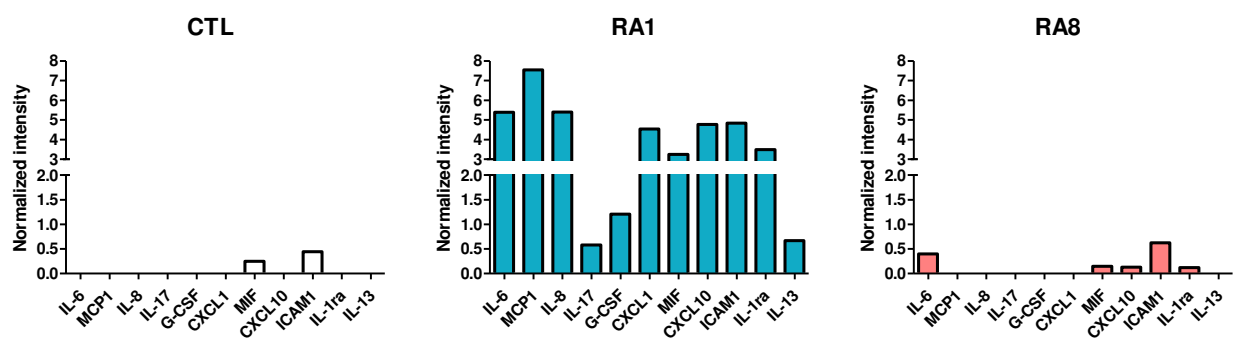
**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Sayegh, El Atat, Diallo, Rauwel, Degboé, Cavaignac, Constantin, Cantagrel, Trak-Smayra, Alaaeddine and Davignon. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



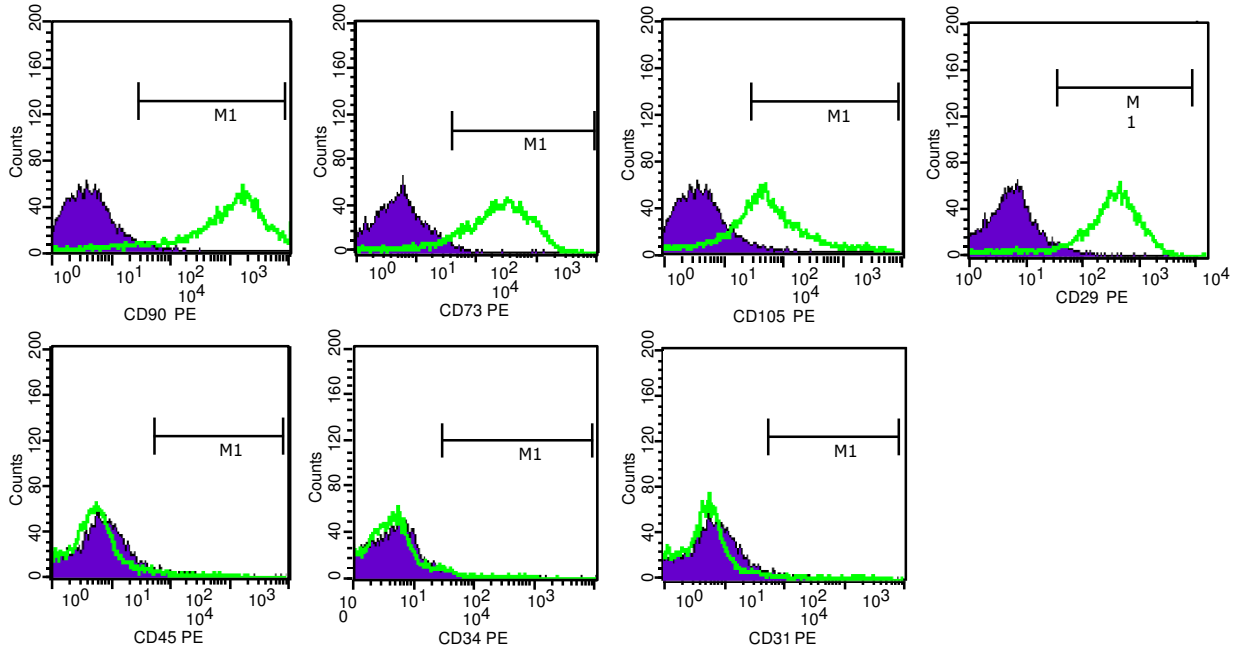
**Table S1. List of primer sequences**

<b>Gene</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
RPS9	GATTACATCCTGGGCCTGAA	ATGAAGGACGGGATGTTAC
COX-2	TGACCAGAGCAGGCAGATGAA	CCACAGCATCGATGTCACCATAG
IDO	GCCCTTCAAGTGTTTCACCAA	CCAGCCAGACAAATATATGCGA
IL-6	CCACACAGACAGCCACTCAC	CCAGATTGGAAGCATCCATC
TSG-6	AGGCGGTGTGTGAATTTGAAG	GGCTGCCTCTAGCTGCTTGT
ICAM-1	CCTTCCTCACCGTGTACTGG	AGCGTAGGGTAAGGTTCTTGC
VCAM-1	GGCGCCTATACCATCCGAAA	AGAGCACGAGAAGCTCAGGAGAA
PD-L1	GGCATCCAAGATACAAACTCAA	CAGAAGTTC CAATGCTGGATTA
TGF-BETA	CGCGTGCTAATGGTGGA	TGTGTGTACTCTGCTTGAACCTGTCA
TIMP3	CAGGACGCCTTCTGCAACTC	AGCTTCTTCCCCACCACTT
STC1	GTGGTTCGTTGCCTCAACAGT	GTGTCACAGGTGGAGTTTTCCA

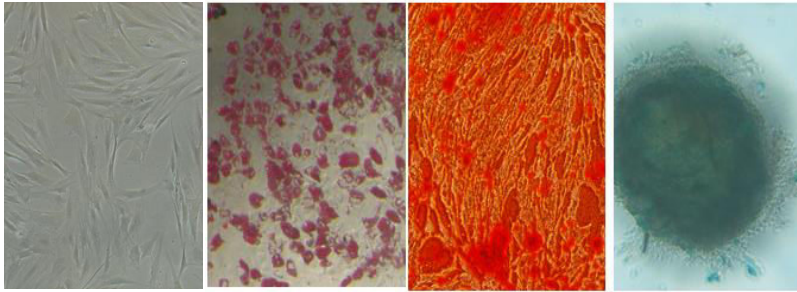


**Figure S1. Evaluation of synovial fluids inflammatory status.** Graphical representation of Figure 1A. SF were represented depending on their inflammatory status (blue being very pro-inflammatory, red slightly inflammatory). Pro-inflammatory mediators IL-6, MCP1, IL-8, IL-17, G-CSF, MIF, CXCL10, ICAM-1, IL-1RA, IL-13 were identified and semi-quantified using an antibody-based membrane array in CTL, RA1 and RA8 synovial fluids.

**A**

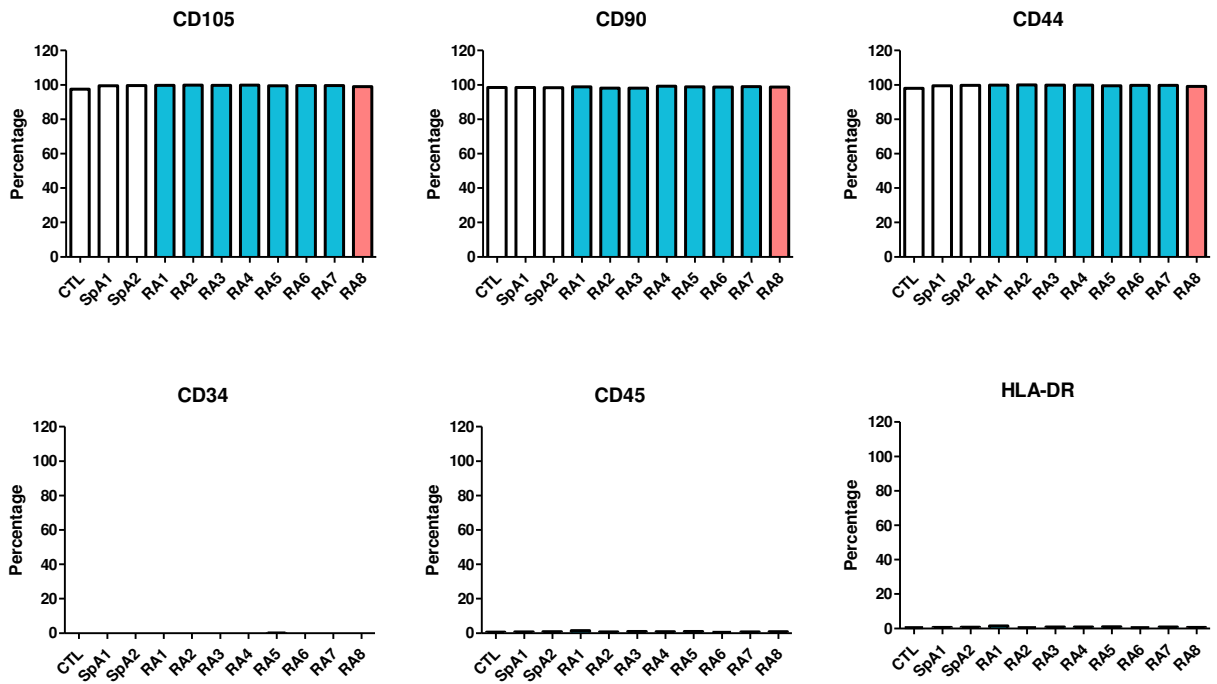


**B**

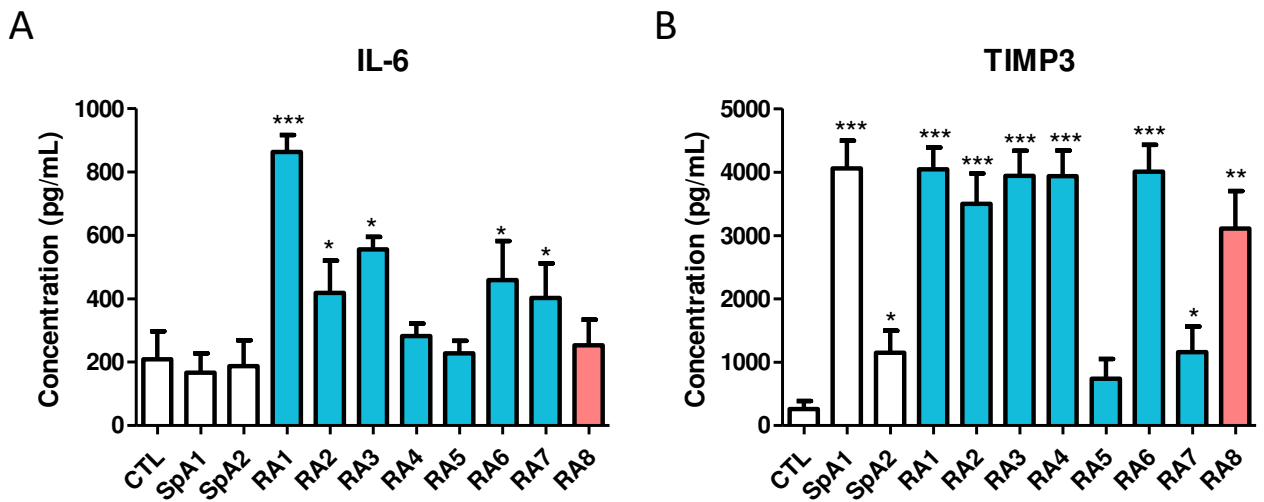


**Figure S2. Characterization of ADSC phenotype and differentiation potential.** (A) ADSC were stained with indicated antibodies and analyzed by flow cytometry. Histograms are representative of 5 independent experiments. Green lines represent stained cells and purple filled histograms their isotype-matched control. (B) ADSC were cultured in the presence of adipogenic, osteogenic or chondrogenic media for 21 days and then stained with either Oil Red O (middle left panel), Alizarin Red (middle right panel) and Alcian Blue (right panel) respectively. ADSC cultured alone served as a negative control (left panel) (magnification x10)

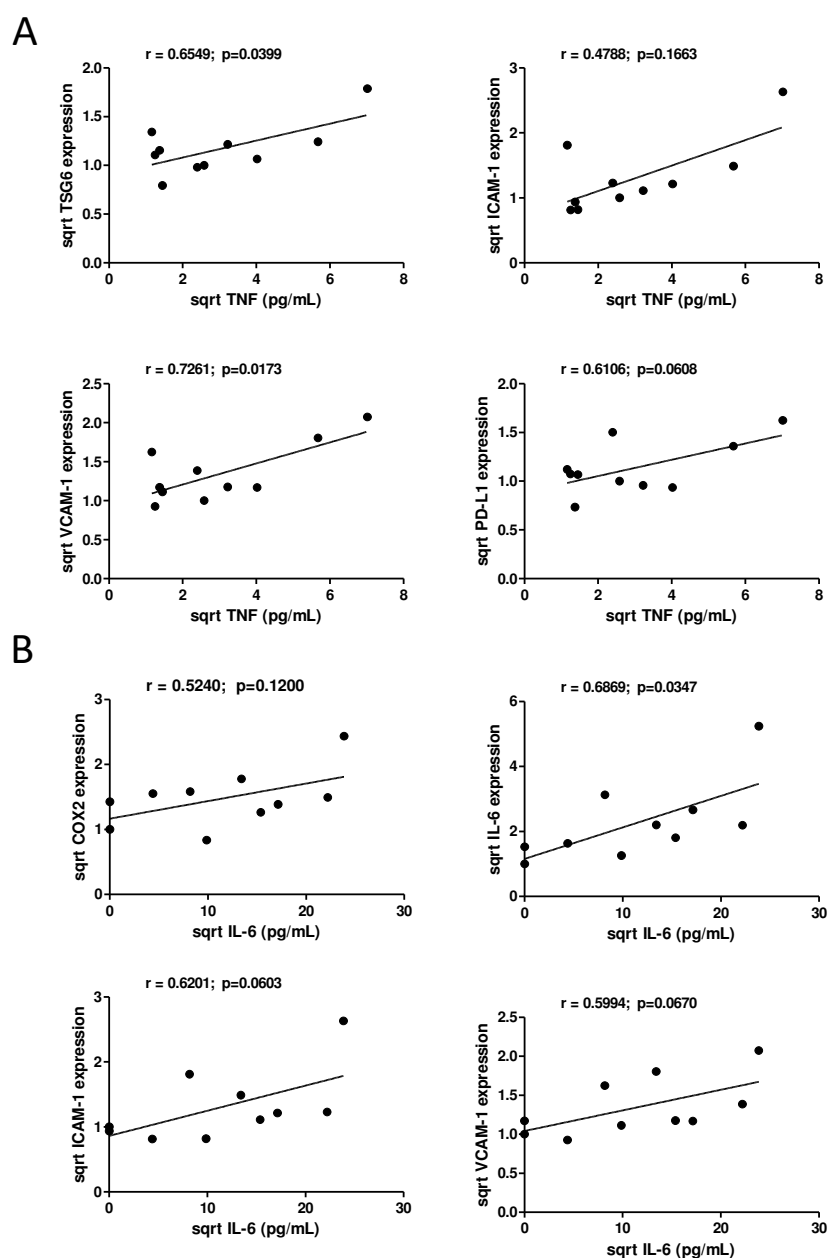




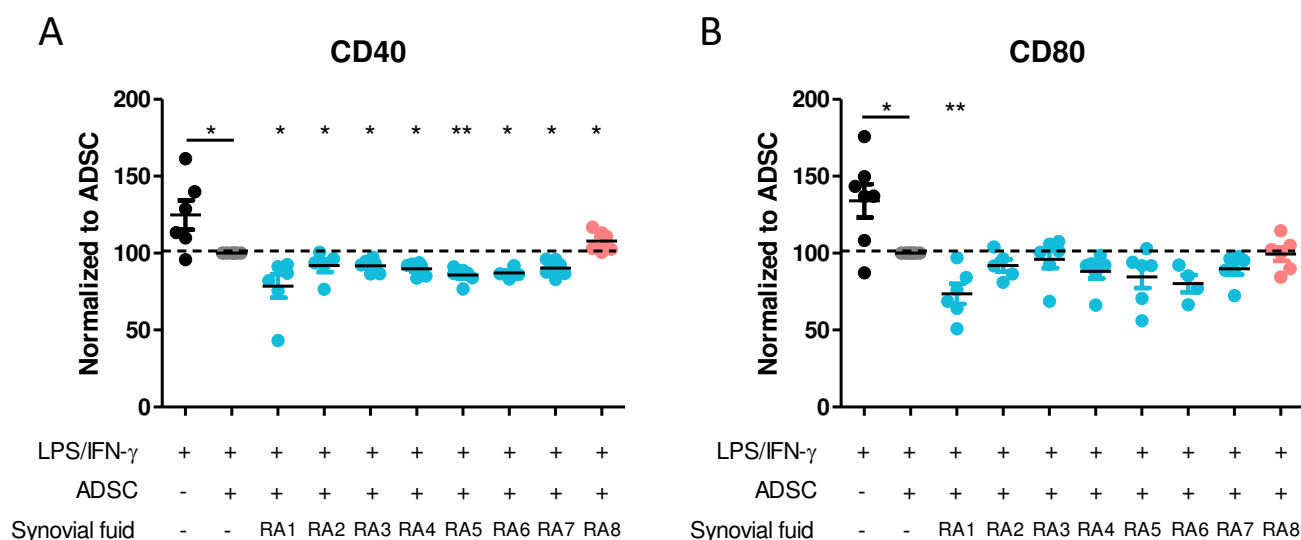
**Figure S3. The phenotype of ADSC is not altered after SF treatment.** ADSC were cultured for 24 hours in the presence of SF from either RA, SpA or CTL patients. Cells were then harvested and stained with anti-CD105, anti-CD90, anti-CD44, anti-CD34, anti-CD45 and anti-HLA-DR for their flow cytometry immunophenotyping.



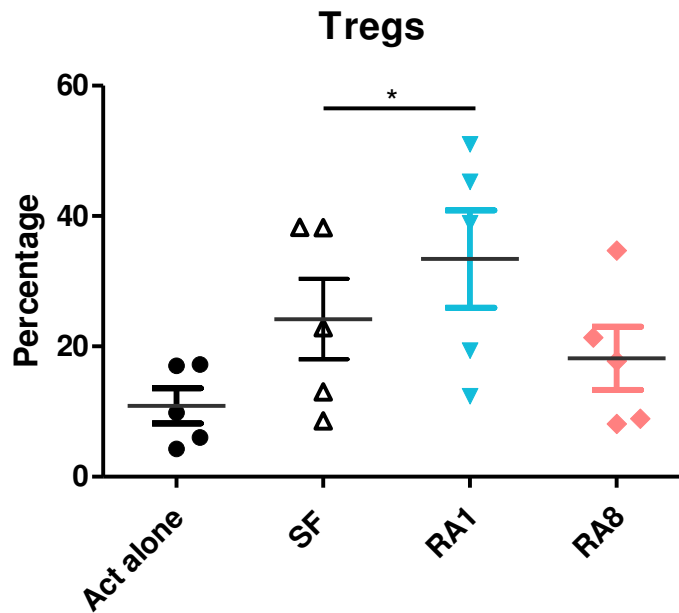
**Figure S4. Differential effect of synovial fluids on ADSC secretion of IL-6 and TIMP3.** ADSC were cultured for 24 hours in the presence of SF from either RA, SpA or CTL patients. (A) IL-6 and (B) TIMP3 were quantified in ADSC supernatants by ELISA. Results are represented as mean  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. \*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$ ; \*\*\*:  $p<0.001$ .



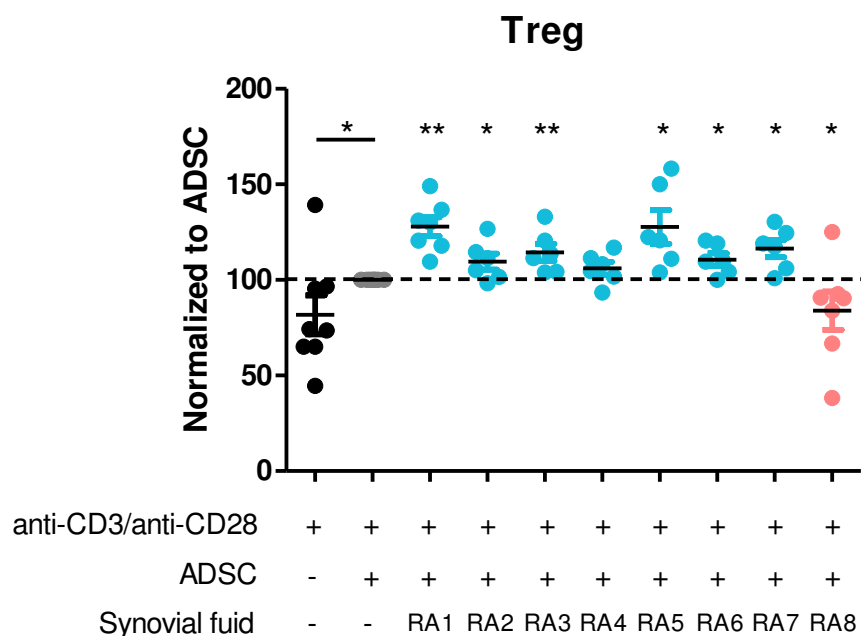
**Figure S5. Correlation between TNF and IL-6 SF concentrations and ADSC gene expression.** (A) Correlation (Pearson) between TNF concentrations and TSG6, ICAM-1, VCAM-1 and PD-L1 ADSC gene expression. (B) Correlation (Pearson) between IL-6 concentrations and COX-2, IL-6, ICAM-1 and VCAM-1 ADSC gene expression.



**Figure S6. Conditioning ADSC with pro-inflammatory RASF enhances their ability to inhibit CD40 and CD80 expression in macrophages.** ADSC were plated in 48-well plates and stimulated for 24 hours with RA1 to RA8. The following day, activated macrophages from healthy donors were added to ADSC at a ratio of 1:5 for 24 hours. Cells were then harvested and stained with anti-CD40 (**A**) and anti-CD80 (**B**) for flow cytometry detection of pro-inflammatory markers in macrophages. Results are represented as mean  $\pm$  SEM of 4-7 independent experiments. Activated macrophages cultured in the presence of ADSC conditioned with different RASF were compared to those cultured in the presence of ADSC control. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .



**Figure S7. Conditioning ADSC with pro-inflammatory RASF enhances their ability to induce Tregs in PBMC.** ADSC were plated in 96-well plates and stimulated for 24 hours with SF control, RA1 or RA8. The following day, ADSC were washed and PBMC cells from healthy donors were added to ADSC at a ratio of 1:5 and activated with beads coated with anti-CD3/CD28 for 72 hours. Cells were harvested and stained with anti-CD4, anti-CD25 and anti-Foxp3 for flow cytometry detection of Tregs. Results are represented as mean  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. \*:  $p < 0.05$ .



**Figure S8. Conditioning ADSC with pro-inflammatory RASF enhances their ability induce Tregs.** ADSC were plated in 96-well plates and stimulated for 24 hours with RA1 to RA8. The following day, ADSC were washed and T cells from healthy donors were added to ADSC at a ratio of 1:5 and activated with beads coated with anti-CD3/CD28 for 72 hours. Cells were then harvested and stained with anti-CD4, anti-CD25 and anti-Foxp3 for flow cytometry detection of Tregs. T cells activated in the presence of ADSC conditioned with different RASF were compared to those activated in the presence of ADSC control. Results are represented as mean  $\pm$  SEM of 6-7 independent experiments. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .

## Résultats complémentaires

### Objectif :

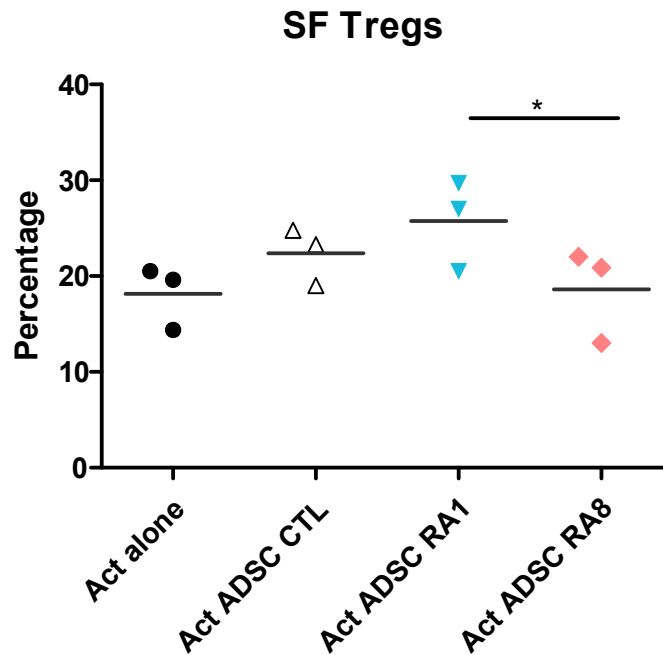
Ayant montré un effet direct des RASF sur le potentiel immunomodulateur des ADSC, nous avons voulu déterminer l'effet des RASF sur la capacité des ADSC à induire des lymphocytes Tregs synoviaux chez les cellules mononucléées de l'articulation qui sont directement impliquées dans la physiopathologie de la PR.

### Matériels et méthodes :

Les cellules mononucléées du liquide synovial (SFMC) de patients atteints de PR ont été isolées par le traitement des SF avec de la hyaluronidase (0,5 mg/ml) suivi d'une centrifugation en gradient de densité. Les ADSC ont étéensemencées et stimulées pour 24 heures avec les différents SF avant d'être lavées et mises en co-culture avec les SFMC à un ratio de ADSC:SFMC 1:5 pour 72 heures. Les cellules en culture ont été ensuite marquées par les anticorps anti-CD4-FITC, anti-CD25-PECy5 et anti-Foxp3-PE ainsi qu'avec leurs isotypes respectifs (BD Biosciences) et le pourcentage de Tregs a été déterminé par cytométrie en flux. Ces expériences ont été détaillées dans la partie Matériels et Méthodes de l'article précédent.

### Résultats et conclusion:

Comme observé avec les LT et PBMC, les ADSC conditionnées avec RA1 sont effectivement plus efficaces dans l'induction des Tregs dans les SFMC que le RA8 (**figure 30**). Ces résultats confirment donc l'effet inducteur des RASF pro-inflammatoires sur le potentiel immunomodulateur des ADSC, non seulement sur les LT et PBMC isolées de sujets sains mais également sur les SFMC isolées des patients atteints de PR.



**Figure 30. Le conditionnement des ADSC par des RASF pro-inflammatoires augmente leur capacité à induire des Tregs.** Les ADSC ont été stimulées pour 24 heures avec les différents SF et ensuite lavées et mises en co-culture avec les SFMC isolées de patients atteints de PR et activées avec des billes anti-CD3/anti-CD28 pour 72 heures. Les cellules ont été ensuite marquées par les anticorps anti-CD4, anti-CD25 et anti-Foxp3 et le pourcentage de Tregs a été déterminé par cytométrie en flux. Les résultats sont représentés par la moyenne de 3 expériences indépendantes. \* $p < 0.05$ .



## Partie II

### Effet différentiel des injections d'ADSC dans les modèles d'arthrite expérimentale K/BxN et K/BxN-STA

#### Introduction :

Les MSC ont déjà fait preuve d'une efficacité prometteuse dans l'inhibition de l'arthrite expérimentale dans plusieurs modèles murins tels que le CIA et le CAIA si elles sont injectées au cours d'une fenêtre thérapeutique précise. Nous avons donc voulu évaluer le potentiel thérapeutique des ADSC dans deux nouveaux modèles qui n'ont toujours pas été extensivement étudiés dans le contexte de thérapie cellulaire : les modèles K/BxN et K/BxN-STA.

Comme détaillé dans la partie Introduction, la phase effectrice dans ces deux modèles est principalement due à l'immunité innée. Dans le modèle spontané la phase d'induction des souris K/BxN nécessite une activation par l'immunité adaptative. Les PNN sont activés par les complexes immuns anti-G6PI-G6PI et jouent un rôle important dans l'induction de l'arthrite (42). Les macrophages sont également présents en grand nombre dans la synoviale des souris arthritiques et contribuent à la physiopathologie de l'arthrite comme démontré par les souris déficientes en macrophages qui sont complètement résistantes au développement de la maladie. En effet, il a été montré que les monocytes non-classiques Ly6c<sup>-</sup> infiltrent l'articulation et se différencient en macrophages pro-inflammatoires M1 caractérisés par l'expression d'IL-1 $\beta$ , IL-12, iNOS et CD80 en premier temps, puis sont reprogrammés vers un phénotype pro-résolutif M2 caractérisé par les marqueurs Arg1, CD36 et CD163 qui contribuent à l'homéostasie de l'articulation (62).

Tout comme chez l'homme, le paradigme des macrophages M1/M2 existe donc chez la souris au niveau des articulations, même si cette simplification ne rend pas compte de la complexité des phénotypes. Outre les marqueurs mentionnés ci-dessus, les macrophages M1 expriment différents gènes tels que ceux codants les cytokines pro-inflammatoires TNF, IL-6 (361). Plus récemment, il a été montré que Gpr18 (G-protein regulator 18) et Fpr2 (Formyl peptide receptor

2) sont tous les deux impliqués dans la polarisation des macrophages M1 même si leur rôle exact n'a toujours pas été clairement identifié (362). Fra-1 (Fos-like antigen 1) a été également montré comme un régulateur de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (363). Les macrophages M2 sont à leur tour caractérisés par l'expression d'Arg1 (Arginase 1), enzyme qui catabolise l'arginine en urée et ornithine, EgR2 (Early growth response 2) qui est un facteur de transcription impliqué dans la polarisation des macrophages M2 et par la production des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et TGF-B (248,361,362).

Au cours de cette étude, avant d'évaluer l'effet des ADSC dans les modèles K/BxN et K/BxN-STA, nous avons d'abord confirmé le potentiel thérapeutique des ADSC *in vitro* sur la prolifération des splénocytes et la modulation du phénotype des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM). Par la suite, nous avons déterminé comment le microenvironnement *in vivo* pourrait affecter le potentiel thérapeutique des ADSC en injectant ces cellules en utilisant des protocoles et « timing » différents (préventif et thérapeutique) ainsi que des voies d'administration différentes (IP, IV, IA).

## **Matériels et méthodes :**

### **1. Préparation et culture des ADSC**

Les ADSC ont été isolées du tissu adipeux sous-cutané de donneurs sains ayant subi une liposuction ou une abdominoplastie. L'isolement, la culture, l'expansion et l'immunophénotypage des ADSC ont été effectués comme décrit dans la Partie 1 des Résultats. Les ADSC de passages 3 à 5 (P3-P5) ont été utilisées pour toutes les expériences.

### **2. Isolement des splénocytes et co-culture avec ADSC**

Les splénocytes ont été isolés de la rate de souris C57BL/6J par dissociation mécanique suivie par une lyse des globules rouges en utilisant le Red blood cell lysis buffer (Sigma-Aldrich). Ils ont été ensuite lavés et marqués par le marqueur de prolifération CellTrace Violet (Life Technologies)

et mis en co-culture dans un milieu DMEM/F12 (Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12 medium, Gibco) supplémenté avec 10% FBS (Fetal bovine serum, Sigma-Aldrich) et 1% PS (Penicillin/streptomycin, Lonza), en présence ou absence d'ADSC à des ratios ADSC:splénocytes 1:40 et 1:2.5, et activés avec des billes anti-CD3/anti-CD28 (Miltenyi Biotec) pour 72 heures. La prolifération des splénocytes a été ensuite évaluée par l'acquisition des cellules sur le cytomètre MACSQUANT Q10 (Miltenyi Biotec) et analysée avec le logiciel FlowJo v7.6.5 (Tree Star).

### **3. Génération des BMDM et co-culture avec ADSC**

Pour la génération des BMDM, les cellules de la moelle osseuse ont été isolées des fémurs et tibias de souris et « flushées » dans des tubes stériles en utilisant des seringues équipées d'aiguilles 23 Gauge et remplies de PBS. Les cellules ont été ensuite filtrées sur des pores de 100  $\mu$ m et les globules rouges ont été lysés par le tampon de lyse. Les cellules ont été par la suite mises en culture dans un milieu DMEM (Gibco) supplémenté avec 10% FBS et 1% PS, en présence de M-CSF (50 ng/mL, Peprotech) pour 5 jours afin de les différencier en macrophages. Après 5 jours de différenciation, les BMDM ont été polarisés vers un phénotype pro-inflammatoire en rajoutant du LPS (100 ng/mL, Sigma-Aldrich) et IFN- $\gamma$  (25 ng/mL, Peprotech) au milieu pour 24 heures. Les BMDM préalablement activés ont été ensuite lavés et rajoutés en co-culture avec les ADSC pour 24 heures supplémentaires à un ratio ADSC:BMDM 1:5.

### **4. Expérimentation animale**

Les souris K/BxN résultent du croisement de souris C57BL/6 possédant un TCR transgénique avec des souris NOD. Ils développent une arthrite à partir de la 4<sup>e</sup> semaine de vie.  $1 \times 10^6$  d'ADSC ont été injectées aux souris K/BxN par voie IP) au moment de l'apparition des symptômes, aux semaines 5 et 6.

Le modèle K/BxN-STA a été induit chez des souris C57BL/6J âgées de 7 semaines par une injection IP de 200  $\mu$ L de sérum de souris K/BxN aux jours 0 et 2 (J0 et J2). Les ADSC ont été injectées

suivant différents protocoles : un protocole préventif ( $1 \times 10^6$  ADSC par voie IP aux J-1 et J1), trois protocoles thérapeutiques ( $1 \times 10^6$  ADSC par voie IP aux J3 et J5,  $1 \times 10^6$  ADSC par voie IP aux J6 et J8 et  $0.5 \times 10^6$  ADSC par voie IA aux J3 et J5). Pour le protocole IA, les pattes des souris ont été prélevées au J10 pour l'extraction d'ARN. Les différents protocoles sont schématisés ci-dessous (Figure 31).

Le gonflement et la rougeur des articulations ont été examinés de façon hebdomadaire pour le modèle K/BxN et quotidiennement pour le modèle K/BxN-STA. La sévérité de l'arthrite a été déterminée par une évaluation de chaque patte suivant un score allant de 0 à 3 (0 = normal, 0.5 = gonflement des doigts, 1 = gonflement faible de la patte, 2 = gonflement évident avec rougeur, 3 = gonflement sévère et rougeur). Un score cumulé des quatre pattes a été calculé pour les injections IP (score maximal 12) et des deux pattes postérieures pour les injections IA (score maximal 6). Quand applicable, l'épaisseur des pattes a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse et un score cumulé des quatre pattes a été ensuite calculé.

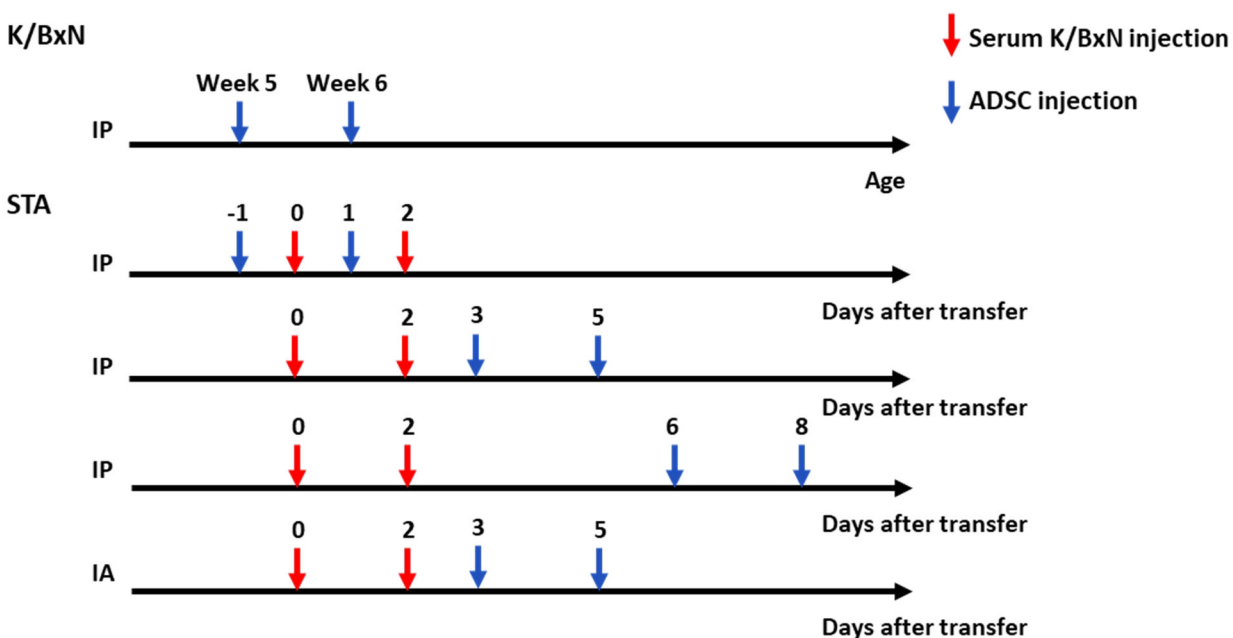


Figure 31. Les protocoles d'injections d'ADSC dans les modèles K/BxN et K/BxN-STA.

## 5. Extraction ARN et RT-qPCR

Les ARN totaux des BMDM mis en co-culture avec les ADSC pour 24 heures ont été extraits avec le High Pure RNA Isolation kit (Roche Diagnostics). Les articulations prélevées des souris ont été d'abord homogénéisées dans du TRIzol Reagent (Invitrogen) à l'aide de l'Ultra-Turrax Homogeneizer (IKA) et les ARN totaux ont été ensuite extraits selon les recommandations du fabricant. L'ADN complémentaire dans les deux cas a été synthétisé à partir de 0.5 µg d'ARN par le RevertAid Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). L'expression des gènes d'intérêt a été ensuite quantifiée par RT-qPCR (PCR quantitative en temps réel) avec le SYBR green mix (Roche Diagnostics) et les primers spécifiés dans le **tableau 10** en utilisant le Light-Cycler 480 Instrument (Roche Diagnostics). Les gènes étudiés pour identifier les macrophages M1 pro-inflammatoires incluent le TNF, IL-1 $\beta$ , IL-12p40, IL-6, Gpr18, Fpr2, Fra-1 et pour identifier les macrophages pro-résolutives M2 : TGF- $\beta$ , Arg1, Egr2. Les valeurs ont été normalisées par rapport à GAPDH et exprimées sous forme de  $2^{-\Delta Ct}$ .

Gene	Forward	Reverse
<b>TNF</b>	CTGTAGCCACGTCGTAGC	TTGAGATCCATGCCGTTG
<b>IL-1B</b>	TTGGGCCTCAAAGGAAAGAAT	TGCTTGTGAGGTGCTGATGTA
<b>IL-12p40</b>	TTGCTGGTGTCTCCACTCAT	GGGAGTCCAGTCCACCTCTA
<b>IL-6</b>	TACCCCAATTTCCAATGCTC	TCTTGGTCCTTAGCCACTCC
<b>Gpr18</b>	GACAGACAGGAGGTTCGACATACA	ACCGAGGTGTGGGTCTCCTTATGT
<b>Fpr2</b>	CTGAATGGATCAGAAGTGGTGG	CCCAAATCACTAGTCCATTGCC
<b>Fra-1</b>	CCCAGTACAGTCCCCCTCA	TCCTCCTCTGGGCTGATCT
<b>TGF-B</b>	AACAATTCCTGGCGTTACCTT	TGTATTCCGTCTCCTTGTTTC
<b>Arg-1</b>	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC
<b>Egr2</b>	GCCAAGGCCGTAGACAAAATC	CCACTCCGTTTCATCTGGTCA
<b>GAPDH</b>	TTCACCACCATGGAGAAGG	CACACCCATCACAAACATGG

**Tableau 10. Liste des primers étudiés.**

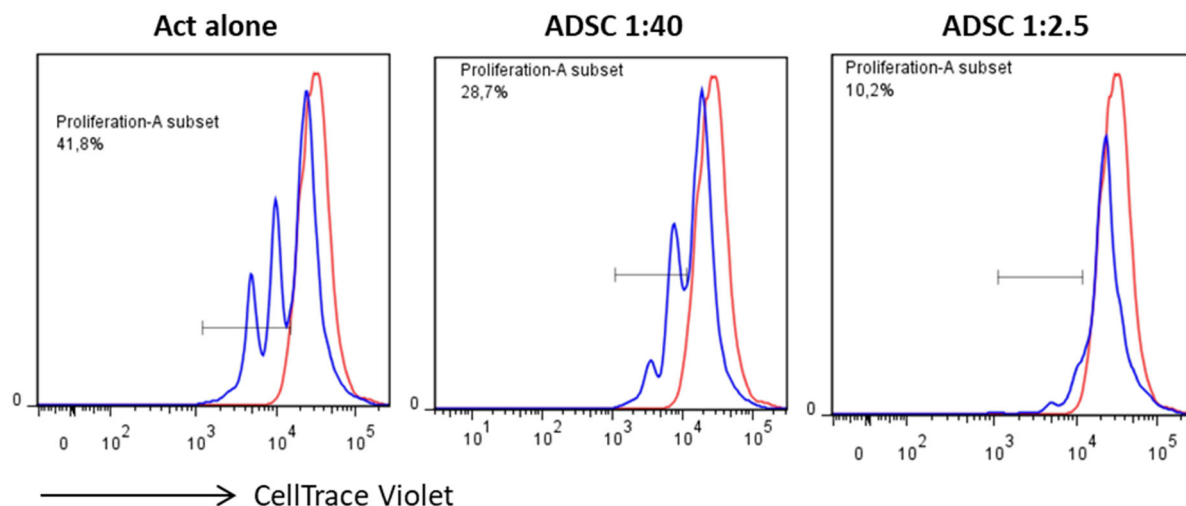
## 6. Analyses statistiques

Les résultats ont été représentés par la moyenne  $\pm$  SEM (standard error mean). Après évaluation de la normalité des données par un test Shapiro-Wilk, l'effet des ADSC sur l'expression des gènes par les BMDM *in vitro* a été déterminé par un test de Student apparié ou un test de Wilcoxon. Les différents groupes de souris ont été à leur tour comparés par un test de Student non-apparié ou un test de Mann-Whitney. Les données ont été analysées avec le logiciel Graphpad Prism v5.00. Les valeurs  $p < 0.05$  ont été considérées comme statistiquement significatives.

## Résultats et discussion:

### 1. Les ADSC inhibent la prolifération des splénocytes *in vitro*

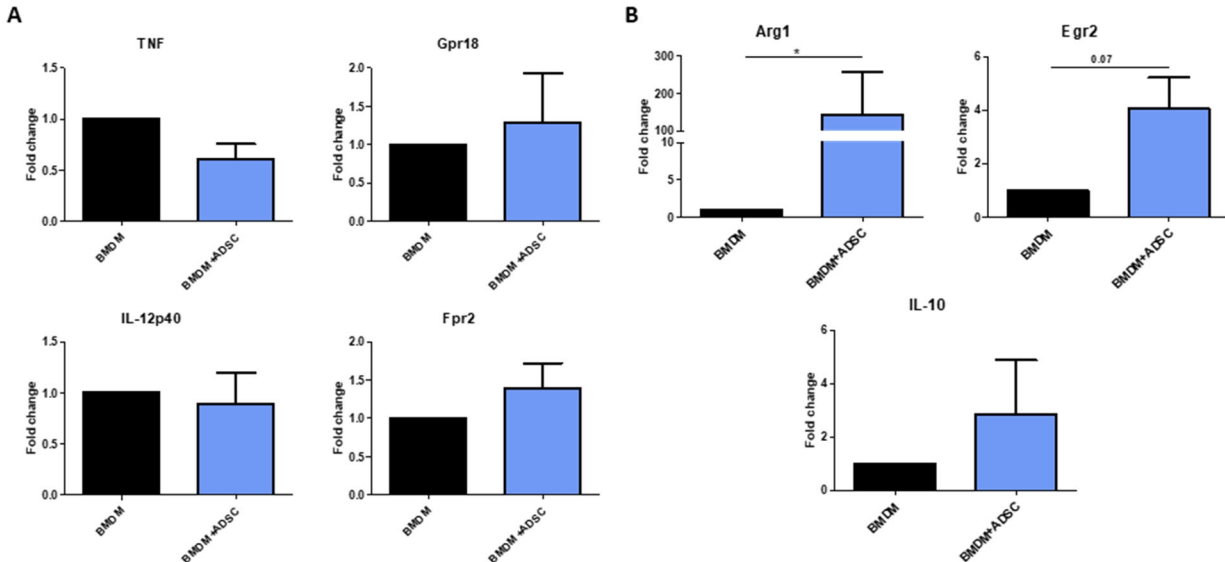
Avant d'évaluer l'effet des ADSC dans les modèles murins d'arthrite expérimentale, nous avons d'abord voulu vérifier leurs effets immunomodulateurs *in vitro*. En effet, les ADSC inhibent la prolifération des splénocytes activés avec des billes anti-CD3/anti-CD28 à des ratios ADSC:splénocytes 1:40, 1:2,5 en conditions de co-culture directe, confirmant ainsi leur potentiel immunosuppresseur (**Figure 32**).



**Figure 32. Les ADSC inhibent la prolifération des splénocytes.** Les splénocytes préalablement marqués avec le CellTrace Violet ont été mis en culture en présence ou absence des ADSC (à des ratios ADSC:splénocytes 1:40 et 1:2.5) et activés avec des billes anti-CD3/anti-CD28 pour 72 heures. Les histogrammes en rouge représentent les splénocytes contrôles marqués non-activés.

## 2. Les ADSC induisent les marqueurs pro-résolutifs des BMDM *in vitro*

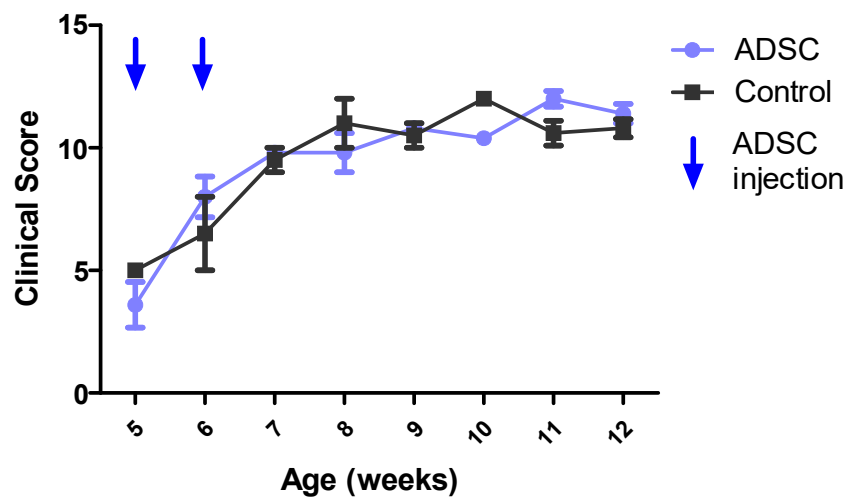
Etant donné que les deux modèles murins K/BxN et K/BxN-STA sont médiés par les PNN et macrophages, nous avons ensuite étudié l'effet des ADSC sur la modulation des marqueurs pro-résolutifs et pro-inflammatoires des BMDM différenciés *in vitro* et polarisés pour 24 heures en un phénotype M1 pro-inflammatoire avec du LPS/IFN- $\gamma$ . Pour ce faire, nous avons étudié l'expression des gènes pro-inflammatoires TNF, IL-12p40, Gpr18 et Fpr2 ainsi que les gènes pro-résolutifs Arg1, Egr2 et IL-10. Après 24 heures de co-culture, les ADSC n'ont pas un effet inhibiteur direct sur les marqueurs pro-inflammatoires des BMDM à l'exception du TNF, quoique non significatif (**Figure 33A**). D'autre part, les ADSC induisent significativement l'expression du marqueur pro-résolutif Arg1 ainsi que les marqueurs Egr2 et IL-10 (**Figure 33B**). Ce manque de significativité pourrait être expliqué par la courte durée de co-culture ADSC:BMDM pour détecter l'effet immunomodulateur des ADSC ainsi que par le nombre limité des échantillons utilisés (n=3-4). Cependant, les résultats suggèrent que les ADSC affectent la polarisation des macrophages *in vitro* en induisant un phénotype pro-résolutif.



**Figure 33. Les ADSC induisent l'expression des gènes pro-résolutifs dans les BMDM.** Les ADSC ont été d'abordensemencées dans des plaques de 48 puits. Le jour suivant, des BMDM préalablement différenciés et activés avec LPS/IFN- $\gamma$  ont été lavés et rajoutés en co-culture avec les ADSC pour 24 heures supplémentaires. **(A)** L'expression des gènes pro-inflammatoires TNF, IL-12p40, GPR18, FPR2 et **(B)** l'expression des gènes pro-résolutifs ont été quantifiées par RT-qPCR. Toutes les valeurs étaient normalisées à GAPDH. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM de 3 à 4 expériences indépendantes. \* $p < 0.05$ .

### 3. Les ADSC n'ont aucun effet sur la progression d'arthrite dans le modèle de souris K/BxN

Afin d'évaluer l'effet des ADSC dans le modèle d'arthrite expérimentale de souris K/BxN, les ADSC ont été administrés aux semaines 5 et 6 en tant que protocole thérapeutique après l'apparition des symptômes de l'arthrite à la 4<sup>ème</sup> semaine de vie des souris. L'injection d'ADSC par voie IP n'a eu aucun effet sur la progression et la sévérité des symptômes (**Figure 34**). Ces résultats ont été également confirmés avec des injections d'ADSC plus précoces aux semaines 4, 5 et 6 (non montré). Cela est en accord avec la seule étude réalisée sur ce modèle par Papadopoulou *et al.* qui n'a observé aucun effet de l'injection de MSC murines dérivées de la moelle osseuse à la semaine 7 sur la progression de l'arthrite (333). Dans cette étude, les auteurs ont expliqué l'échec des MSC dans l'inhibition de l'arthrite par une interaction complexe de ces cellules avec leur microenvironnement *in vivo* qui n'est pas forcément similaire au microenvironnement observé *in vitro*. Spéculant que l'environnement inflammatoire n'a pas potentialisé l'effet thérapeutique des ADSC dans le modèle K/BxN, nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet des ADSC dans un autre modèle d'arthrite expérimentale, le modèle de transfert de sérum de souris K/BxN.

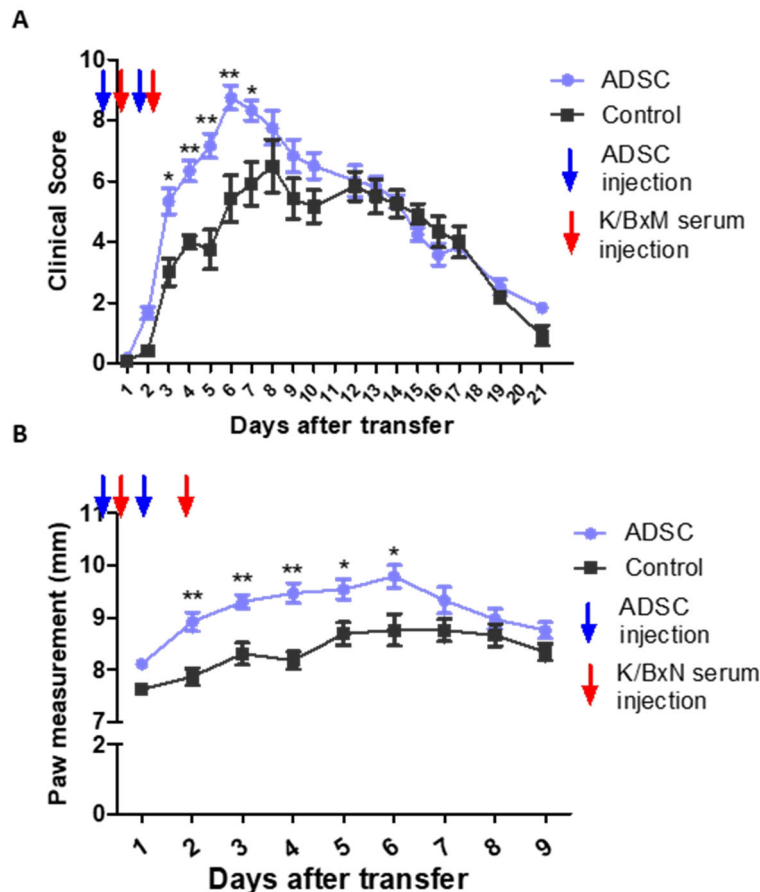


**Figure 34. Les ADSC n'ont aucun effet sur la progression d'arthrite dans le modèle de souris K/BxN.** Les scores cliniques de l'arthrite ont été déterminés hebdomadairement chez les souris K/BxN après injection des ADSC par voie IP aux semaines 5 et 6. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM (n=5 par groupe).



#### 4. Les ADSC aggravent l'arthrite dans le modèle K/BxN-STA quand injectées par voie IP de façon préventive

Afin d'évaluer le potentiel des cellules dans le modèle K/BxN-STA, les ADSC ont été injectées aux J-1 et J1 dans des souris C57BL/6 avant l'induction de l'arthrite par l'injection de sérum K/BxN aux J0 et J2. En utilisant ce protocole, nous avons observé une aggravation de l'arthrite dans ce modèle, confirmé par le score clinique cumulatif ainsi que l'épaisseur des pattes (**Figure 35A,B**). Cette aggravation pourrait en effet être due au manque d'un environnement inflammatoire adéquat *in vivo* au moment de l'induction de l'arthrite pour pouvoir stimuler le potentiel des ADSC, comme observé dans d'autres études sur le modèle CIA où l'injection de MSC au moment de l'immunisation au collagène aggravent également les scores arthritiques (334).

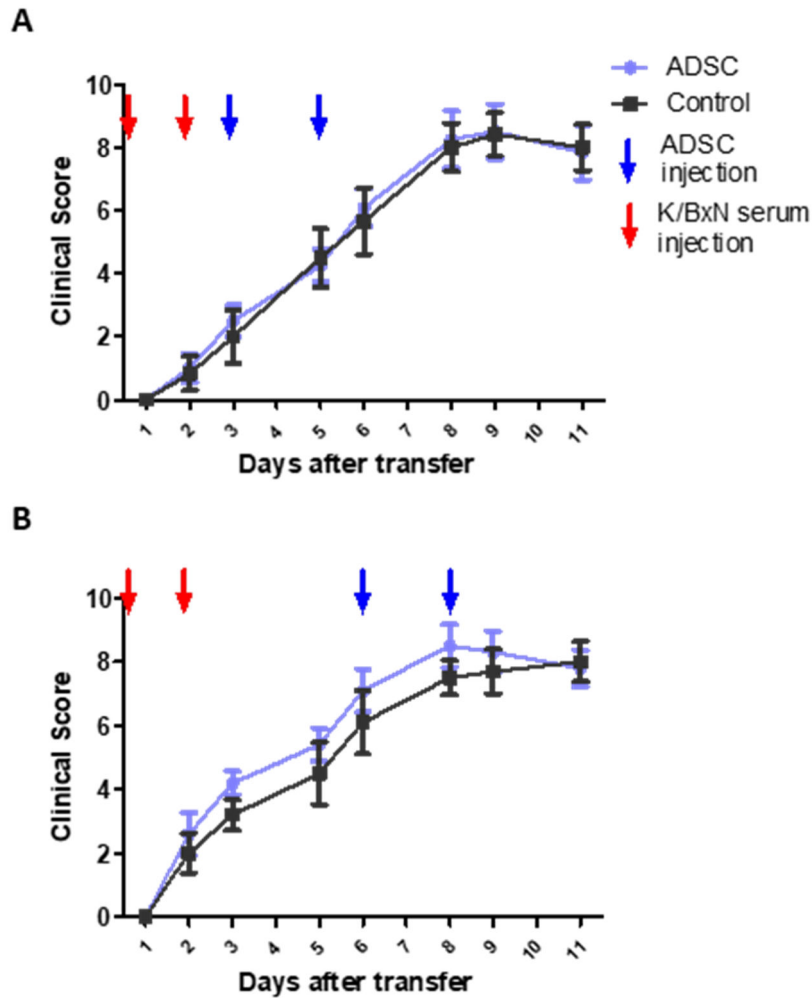


**Figure 35. Les ADSC aggravent l'arthrite dans le modèle K/BxN-STA quand injectées en protocole préventif.** (A) Les scores cliniques de l'arthrite et (B) l'épaisseur des pattes ont été déterminés quotidiennement après injection des ADSC par voie IP aux J-1 et J1. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM et sont représentatifs de 2 expériences indépendantes ( $n=6$  par groupe). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

## **5. Les ADSC n'ont pas d'effet sur la progression de l'arthrite dans le modèle K/BxN-STA quand injectées par voie IP en tant que protocole thérapeutique**

L'injection des ADSC après l'apparition des symptômes en tant que protocole thérapeutique aux J3 et J5 ou au plateau de l'inflammation aux J6 et J8 par voie IP ne présente aucune amélioration de l'arthrite (**Figure 36A,B**). L'effet pro-arthritogène des ADSC observé précédemment dans le protocole préventif est également aboli, ce qui suggère une influence de l'environnement inflammatoire présent *in vivo* sur le potentiel des ADSC qui diffère selon le « timing » des injections. Cependant il est important de noter que les injections aux J6 et J8 montrent un faible déclin des scores cliniques dans le groupe traité mais qui reste insuffisant (**Figure 36B**).

Bien que les cellules soient injectées à un stade plus inflammatoire, il se peut que la progression de l'arthrite dans ce modèle particulier soit trop rapide et agressive pour pouvoir détecter un effet par voie systémique. Nous avons donc par la suite tenté d'améliorer le potentiel thérapeutique des ADSC par une injection par voie IA.



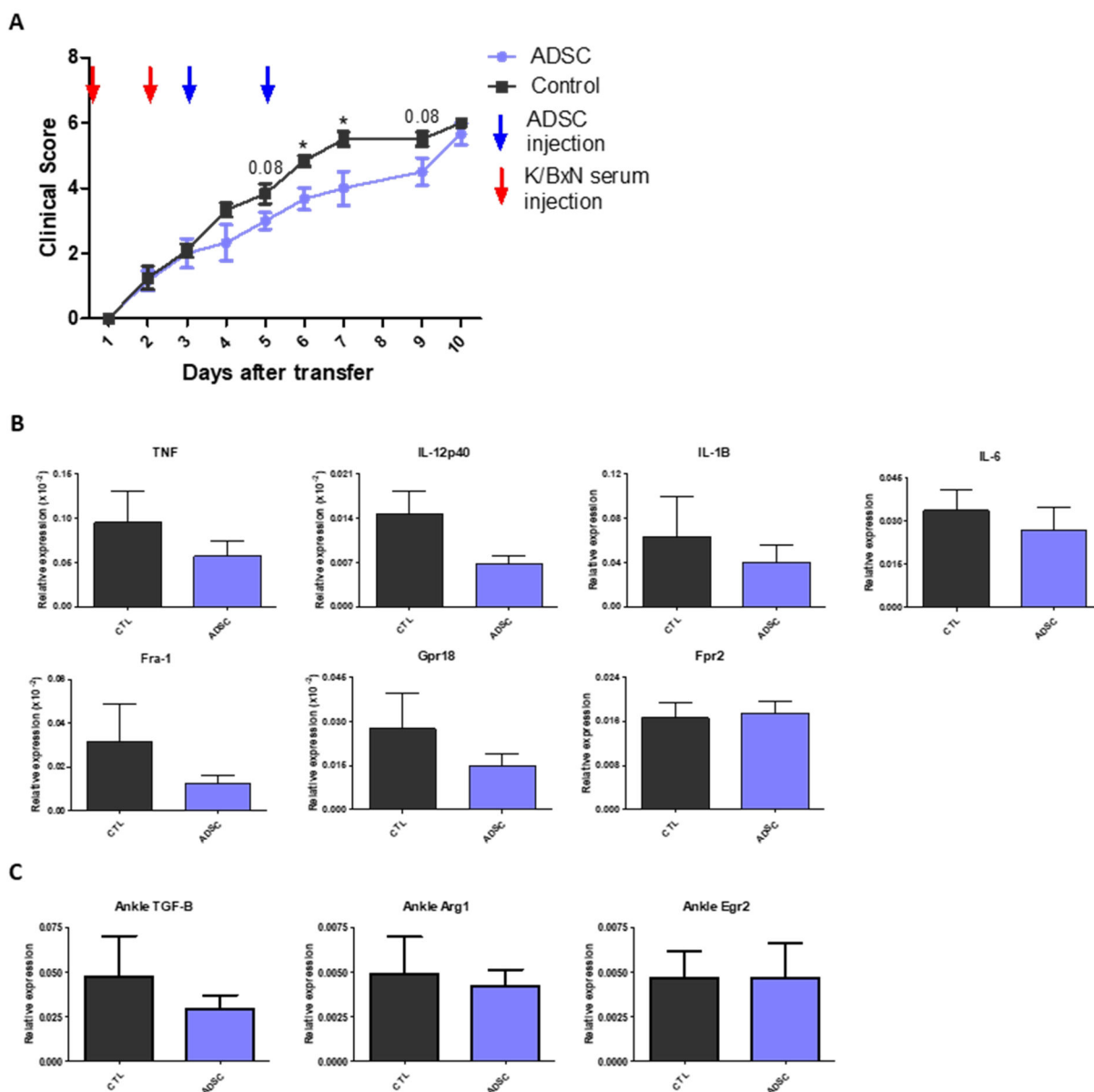
**Figure 36.** Les ADSC n'ont aucun effet sur l'arthrite dans le modèle K/BxN-STA quand injectées en protocole thérapeutique. Les scores cliniques de l'arthrite ont été déterminés quotidiennement après injection des ADSC par voie IP (A) aux J3 et J5 et (B) aux J6 et J8. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM ( $n=5-6$  par groupe).

## 6. L'injection intra-articulaire améliore l'inhibition de l'arthrite par les ADSC en protocole thérapeutique – Résultats préliminaires

Contrairement à l'inefficacité des ADSC à contrôler l'arthrite par voie IP, l'injection des cellules par voie IA dans le genou des souris en utilisant le même protocole thérapeutique J3 et J5 inhibe significativement les scores cliniques observés au niveau des pattes (**Figure 37A**). Cet effet différentiel des ADSC pourrait être en effet expliqué par l'administration directe des ADSC dans l'articulation inflammatoire capable de stimuler leur potentiel thérapeutique loin des obstacles

de l'injection par voie IP (rétention possible des ADSC par les poumons, milieu inflammatoire insuffisant, etc.). Conformément à cette hypothèse, une étude par Brines *et al.* a rapporté des concentrations plus élevées de cytokines inflammatoires dans l'articulation que dans le sérum de ce modèle (364).

Nous avons ensuite voulu déterminer si l'injection des ADSC avait un effet fonctionnel sur l'expression des gènes impliqués dans la polarisation des macrophages pro-inflammatoires et pro-résolutifs dans l'articulation. Nous avons en effet détecté une tendance vers l'inhibition des marqueurs pro-inflammatoires M1 TNF, IL-12p40, Fra-1 et Gpr18 quoique non-significative comme il s'agissait d'une expérience préliminaire où les pattes ont été prélevées au J10 dans un temps où l'effet inhibiteur des ADSC n'était plus observable sur un plan clinique (**Figure 37B**). D'autre part, aucun effet n'a été observé sur les marqueurs pro-résolutifs (**Figure 37C**). Pareillement, aucun effet des ADSC n'a été observé concernant l'infiltration cellulaire au niveau des articulations par histochimie (non montré). Ces résultats restent à confirmer par la répétition de l'expérience accompagné d'un prélèvement de pattes à un temps plus précoce.



**Figure 37. L'injection des ADSC par voie IA inhibe l'arthrite dans le modèle K/BxN-STA quand injectées en protocole thérapeutique. (A)** Les scores cliniques de l'arthrite ont été déterminés quotidiennement après injection des ADSC par voie IA aux J3 et J5. L'expression des gènes **(B)** pro-inflammatoires TNF, IL-12p40, IL-1B, IL-6, Fra-1, GPR18, FPR2 et **(C)** pro-résolutifs TGF-B, Arg1 et Egr2 a été quantifiée au niveau des articulations prélevées au J10. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM ( $n=6$  par groupe). \* $p<0.05$ .

## **Conclusion:**

De façon globale, ces résultats mettent en avant l'effet différentiel des ADSC selon le modèle d'arthrite utilisé d'une part, et le « timing » ainsi que la voie d'injection d'autre part. Cette étude est la première à montrer un effet bénéfique des ADSC dans le modèle K/BxN-STA. Une injection par voie IA améliore en effet le potentiel thérapeutique des ADSC contrairement aux injections IP qui n'ont montré aucun effet ou même une aggravation des symptômes dans un stade précoce de l'arthrite dans les modèles K/BxN et K/BxN-STA. L'amélioration de l'effet des ADSC par voie IA est probablement due à une meilleure stimulation de leur activité immunomodulatrice par l'environnement inflammatoire présent dans l'articulation.

Les limitations de l'utilisation des MSC *in vivo* ainsi que leur susceptibilité à leur microenvironnement devront donc être pris en compte afin de maximiser leur potentiel dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.

---

# Discussion générale et perspectives

---

Depuis des décennies, la découverte des MSC et de leurs fonctions trophiques variables, anti-apoptotique, anti-fibrotique, pro-angiogénique et immunomodulatrice a entamé une multitude d'études évaluant leurs effets thérapeutiques dans différentes maladies dont les maladies auto-immunes et, plus spécifiquement, la PR.

Ayant fait preuve d'une efficacité remarquable dans l'inhibition des réponses immunitaires inflammatoires *in vitro*, il n'est pas surprenant qu'un grand espoir soit accordé à l'utilisation des MSC dans le traitement de la PR. Cependant, il persiste de nombreuses limitations à surmonter pour pouvoir atteindre cet objectif. Une limitation majeure qui reste difficile à contrôler est l'influence de l'environnement inflammatoire sur le potentiel thérapeutique des MSC. En effet, des études *in vitro* utilisant un système de titration de cytokines ont montré une grande plasticité immunomodulatrice des MSC vis-à-vis du milieu inflammatoire : une stimulation par des concentrations élevées de cytokines inflammatoires IFN- $\gamma$ , TNF engendre une réponse immunosuppressive importante de la part des MSC tandis qu'en présence de basses concentrations, les MSC agissent comme des activateurs du système immunitaire et contribuent au processus inflammatoire (290,365). Théoriquement, cela voudrait dire que les MSC introduites dans un environnement très inflammatoire se comportent différemment de celles introduites dans un milieu peu inflammatoire.

Etant donné que le type du stimulus inflammatoire et les concentrations des cytokines présentes au cours de la PR varient énormément selon la progression et les différents stades de la maladie, l'objectif principal de mon projet de thèse était de déterminer comment l'environnement inflammatoire pourrait fonctionnellement dicter le potentiel thérapeutique et immunomodulateur des ADSC. Que ce soit par une approche translationnelle *in vitro* ou *in vivo*, nous avons montré que le potentiel immunomodulateur des ADSC dépend profondément du microenvironnement cytokinique et/ou articulaire qu'elles rencontrent. Un environnement inflammatoire adéquat est donc primordial pour induire leur potentiel dans le traitement de la PR.



## Evaluation de l'effet des RASF sur le potentiel immunomodulateur des ADSC

Dans la première partie de cette étude, afin de mimer les différents scénarios d'inflammation présents au cours de la PR, nous avons choisi d'utiliser des liquides synoviaux acellulaires isolés de patients atteints de PR. Après avoir caractérisé le statut inflammatoire de chaque RASF, nous avons premièrement montré que les RASF inflammatoires maintiennent le phénotype et la capacité proliférative des ADSC, contrairement à des études qui ont mis en évidence que l'inflammation pourrait induire l'expression du MHC-II par les cellules, les rendant ainsi susceptibles à un rejet par l'hôte (290,366). Ici, nous montrons qu'aucun des RASF ne modifie l'expression des marqueurs phénotypiques des ADSC y compris le MHC-II. L'environnement articulaire reflété par les RASF ne pose donc pas de limitations sur deux propriétés très importantes des ADSC qui sont nécessaires pour exercer leur effet thérapeutique : la propriété immuno-évasive ainsi que la propriété proliférative et ce, indépendamment du statut inflammatoire des RASF.

Par la suite, nous avons montré que les RASF pro-inflammatoires induisent l'expression des gènes COX-2, IDO, IL-6, TSG-6, ICAM-1, VCAM-1 et PD-L1 qui sont tous impliqués dans l'effet immunomodulateur des ADSC. De plus, RA1 qui était classé comme le liquide synovial le plus inflammatoire a montré l'effet inducteur le plus fort (une induction de 30 fois plus de l'expression d'IDO et IL-6 par RA1, comparé à une moyenne de 11 fois plus par les autres RASF). RA1 a donc été considéré pour le reste de l'étude comme un RASF pro-inflammatoire prototype pour l'induction du potentiel immunomodulateur des ADSC. En revanche, contrairement aux RASF fortement inflammatoires, le RA8, classé comme le moins inflammatoire, a tendance à inhiber les gènes mentionnés *supra* comparé au SF contrôle. Conformément à ces résultats, Leijds *et al.* ont montré une induction de l'expression d'IDO par des BMSC conditionnés avec des RASF (367). Cependant, la différence principale avec notre étude est que ce groupe a représenté la moyenne de tous les RASF comparée à la moyenne des SF contrôles ou des SF isolés de patients atteints d'arthrose sans prendre en compte l'hétérogénéité inflammatoire présente au niveau des différents RASF.

La corrélation entre la concentration de TNF et IL-6 dans les RASF et l'induction de l'expression de certains gènes par les ADSC nous a ensuite poussé à évaluer le rôle de ces deux cytokines sachant que, conformément à ce qui a été rapporté dans la littérature, l'IFN- $\gamma$  n'a pas été détecté dans les RASF (126,368). Une concentration élevée de TNF est en effet essentielle à l'induction du potentiel immunomodulateur des ADSC comme démontré par son inhibition dans les RASF. L'IL-6 a aussi un effet similaire mais qui reste moins important que celui du TNF. Conformément à ces résultats et d'une manière intéressante, le rajout des cytokines recombinantes TNF et IL-6 au SF peu inflammatoire améliore son effet inducteur sur les ADSC. Cependant comme l'inhibition du TNF et IL-6 n'a pas complètement supprimé l'effet des RASF, il est fort possible que d'autres cytokines jouent également un rôle inducteur, comme par exemple l'IL-1 $\beta$  et IL-17 utilisés pour le pré-conditionnement des MSC dans des études menées par Redondo-Castro *et al.* et Bai *et al.*, respectivement (369,370). Il serait donc intéressant d'élargir le spectre de médiateurs solubles étudiés dans les RASF pouvant influencer les MSC, non seulement les cytokines inflammatoires mais aussi les chimiokines et facteurs de croissance éventuellement présents.

D'une autre part, une étude par Xie *et al.* a montré que le conditionnement des MSC par l'IL-6 promeut leur potentiel ostéogénique tandis que d'autres études ont montré que le TNF a des effets contradictoires sur l'ostéogenèse de ces cellules (371–373). Outre le potentiel immunomodulateur, il serait donc intéressant d'évaluer le caractère multipotent des ADSC en présence des différents RASF.

Nous avons également montré qu'une signalisation NF- $\kappa$ B-dépendante est primordiale pour l'induction du potentiel des ADSC puisque l'inhibition de cette voie diminue l'expression des gènes impliqués dans l'effet immunomodulateur des cellules. Ces résultats sont conformes avec une étude par Dorronsoro *et al.* qui a montré que le TNF sécrété par les LT induit le « licensing » des MSC en se liant à son récepteur TNF-R1 à la surface des MSC et activant ainsi la voie NF- $\kappa$ B (236). De plus, l'utilisation des MSC déficientes pour PPAR $\beta/\delta$ , un inhibiteur de NF- $\kappa$ B, a aussi démontré des capacités thérapeutiques dans le contrôle de l'arthrite murine. En se basant sur ces résultats, les auteurs ont donc suggéré de quantifier l'expression de PPAR $\beta/\delta$  chez les MSC

comme un marqueur prédictif de leur efficacité thérapeutique (306). Cependant, d'autres voies pourraient également être impliquées dans la signalisation des RASF telles que les voies JAK/STAT qui affectent l'expression d'IDO et TSG-6, comme expliqué dans la discussion de l'article – Partie I (374,375). Il serait donc important d'explorer les différentes voies de signalisation possibles afin de mieux comprendre la réponse des MSC aux différents stimuli inflammatoires.

Par la suite, après avoir démontré l'effet des ADSC sur les lymphocytes et macrophages *in vitro*, nous avons mis en évidence que les RASF pourraient fonctionnellement affecter ce potentiel immunomodulateur. En effet, le conditionnement par les RASF inflammatoires améliore le potentiel des ADSC à induire des Tregs et à inhiber les marqueurs pro-inflammatoires des macrophages comparé au SF contrôle. Cependant, ces résultats devront être confirmés par des tests fonctionnels afin de valider leur activité comme par exemple des tests de suppression pour les Tregs et des tests fonctionnels pour les macrophages (production de cytokines inflammatoires TNF et IL-12 et production de ROS). Le RASF le moins inflammatoire a, au contraire, un effet inverse sur le potentiel immunomodulateur des ADSC : il inhibe leur capacité à induire des Tregs et à inhiber les marqueurs CD40 et CD80 sur les macrophages. L'intérêt de cette partie est donc de mettre en valeur l'effet différentiel direct du microenvironnement inflammatoire, loin du pré-conditionnement utilisé *in vitro* avec des concentrations très élevées d'IFN- $\gamma$  et TNF (de l'ordre du ng/mL) qui ne reflètent pas forcément les concentrations présentes au niveau des articulations (de l'ordre du pg/mL) (126,365). En tant que perspectives supplémentaires à cette première partie, il serait important de valider les résultats observés sur les LT et macrophages isolés du sang périphérique de donneurs sains en étudiant l'effet du conditionnement des ADSC sur les cellules isolées du sang de patients atteints de PR ou encore sur les cellules présentes dans l'articulation-même (résultats complémentaires Partie I) tels que les SFMC et les cellules mononucléées de la membrane synoviale. Ces cellules sont en effet directement impliquées dans la physiopathologie de l'arthrite et sont en contact direct avec les ADSC après leur injection.

Au cours de cette partie, nous avons choisi de nous focaliser uniquement sur le rôle des cytokines mais il est important de souligner qu'il existe d'autres facteurs présents dans les RASF qui

peuvent également moduler l'activité des ADSC. Par exemple, les miRNA peuvent influencer l'effet des ADSC et cela a été spécifiquement montré par une étude par Mallinson *et al.* où une la réponse thérapeutique aux injections d'ADSC par voie systémique chez les patients atteints de PR est positivement corrélée avec la présence des biomarqueurs miR-26b-5p, miR-487b-3p et miR-495-3p dans le plasma des patients répondeurs (376). De plus, d'autres constituants du liquide synovial comme les ligands de TLR (y compris le matériel génétique) devront être pris en compte dans le but de mieux comprendre l'effet des RASF sur le potentiel immunomodulateur des ADSC.

L'environnement inflammatoire articulaire est donc un élément tranchant qui dicte le potentiel thérapeutique des ADSC soit vers l'inhibition des acteurs immunitaires impliqués dans la physiopathologie de la PR et l'induction d'une réponse régulatrice ou au contraire, soit vers une abrogation complète de leur effet. De plus, avec le développement actuel des nombreux essais cliniques qui évaluent l'effet thérapeutique des ADSC en clinique, il devient de plus en plus clair que l'hétérogénéité inflammatoire des patients atteints de PR ainsi que le stade de la maladie sont des variables très importantes à prendre en compte (4). L'injection des ADSC directement dans l'articulation inflammatoire pourrait donc surmonter les limitations de l'inflammation et maximiser l'effet thérapeutique de ces cellules dans les essais cliniques. La quantification du taux de TNF et IL-6 présents dans le RASF pourrait également aider à prédire l'efficacité des ADSC dans le traitement de la PR mais cela nécessiterait des études plus approfondies.

### **Evaluation du potentiel thérapeutique des ADSC dans les modèles K/BxN et K/BxN-STA**

Pour donner suite à la première partie de la thèse, nous avons voulu traduire fonctionnellement l'effet de l'environnement inflammatoire observé *in vitro* sur des modèles murins d'arthrite expérimentale. Le but était d'évaluer d'une part le potentiel des ADSC dans des modèles murins qui n'ont pas été suffisamment étudiés dans le contexte de thérapie cellulaire

et de déterminer d'autre part l'effet de différents « timing » d'injection et de voies d'administration sur le potentiel thérapeutique des ADSC.

Etant donné que les ADSC utilisées étaient des cellules souches d'origine humaine, la première étape a été de vérifier qu'elles étaient en effet immunomodulatrices *in vitro*. Nous avons montré que les ADSC inhibent la prolifération des splénocytes et modulent le phénotype des BMDM en induisant les marqueurs pro-résolutifs M2 sans cependant avoir un effet particulier sur les marqueurs pro-inflammatoires M1. Ces résultats ne reflètent pas d'autres études menées par Luz-crawford *et al.* et Lin *et al.* qui ont montré une inhibition des marqueurs pro-inflammatoires TNF, CD86 et MHC-II par les MSC murines (263,373). La différence dans les résultats pourrait être due aux différents protocoles utilisés. En effet, dans notre étude nous avons fait le choix de polariser les macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire avant de les mettre en co-culture avec les ADSC et ce, pour ne pas rajouter du LPS/ IFN- $\gamma$  nécessaires pour la polarisation des macrophages directement aux ADSC et créer un biais par l'engagement du TLR4 ou de l'IFN- $\gamma$ R. Les autres études ont polarisé les macrophages pendant 24 heures en présence des MSC par co-culture directe ou indirecte.

De plus, comme les macrophages pro-inflammatoires M1 expriment d'autres marqueurs que ceux présentés dans la Partie II des Résultats, il serait important d'étudier l'expression de CD80, CD86, MHCII et iNOS par cytométrie en flux et par RT-qPCR afin de mieux évaluer la modulation de la polarisation des macrophages par les ADSC.

Concernant les études *in vivo*, nous avons montré que les ADSC n'ont aucun effet sur la progression de l'arthrite dans le modèle spontané K/BxN quand les cellules sont injectées juste après l'apparition des symptômes. Papadopoulou *et al.* ont montré des résultats similaires avec l'injection de MSC murines. Cependant, ils ont mis en évidence que si les MSC sont injectées après l'administration du bortézomib, elles inhibent la progression de l'arthrite confirmant ainsi la plasticité immunomodulatrice des cellules vis-à-vis de l'environnement inflammatoire (333). Dans ce cas-là, une injection intra-articulaire directe des ADSC pourrait être envisagée dans une étude ultérieure afin de détecter un effet thérapeutique dans le modèle K/BxN.

En ce qui concerne le modèle K/BxN-STA, les injections par voie IP en protocole préventif, où les ADSC sont injectées aux J-1 et J1 avant l'induction de l'arthrite, aggravent les scores arthritiques d'une manière transitoire. Cela est en accord avec une étude par Chen *et al.* qui a montré également une aggravation de l'arthrite dans le modèle CIA quand les MSC sont injectées par voie IV au J21, au moment de l'injection « boost » 3 semaines après la première immunisation au collagène. Cette aggravation est accompagnée par l'induction de l'IL-6 qui favorise la différenciation des lymphocytes Th17 (334). En effet, nous spéculons qu'avec un protocole préventif, les ADSC potentialisent l'effet pro-arthritogène du sérum. Comme discuté plus haut, une hypothèse possible est qu'en présence de basses concentrations de cytokines inflammatoires, ces dernières induisent la production des chimiokines par les ADSC telles que l'IL-8, CXCL9 et CXCL10 recrutant ainsi les cellules immunitaires, sans induire la sécrétion de médiateurs solubles capables de les inhiber, ce qui pourrait effectivement entraîner les ADSC à activer davantage la réponse immunitaire.

Il existe cependant plusieurs autres études sur le modèle CIA qui ont montré que l'injection systémique des MSC aux J18 et J24 ou aux J31 à J36 après immunisation réduisent la sévérité de l'arthrite (248,257). Nous avons donc répété les injections d'ADSC après l'induction de l'arthrite par le sérum K/BxN en protocole thérapeutique: au début des symptômes aux J3 et J5 et au plateau inflammatoire aux J6 et J8. Nous avons montré que dans ces deux protocoles, l'aggravation des symptômes par les ADSC est complètement abolie, ce qui confirmerait un rôle éventuel du microenvironnement sur le potentiel des ADSC. Cependant, l'injection après le développement de l'arthrite n'entraîne toujours pas une amélioration de l'effet thérapeutique des ADSC.

N'ayant pas trouvé des études antérieures dans la littérature sur l'effet des MSC dans le modèle K/BxN-STA, nous spéculons que les résultats négatifs sont liés à la particularité du modèle murin utilisé et le statut inflammatoire correspondant. En effet, le CIA est considéré comme un modèle différent du K/BxN-STA puisqu'il implique plusieurs types cellulaires (LT, LB, macrophages, PNN) comparé au modèle K/BxN-STA qui implique principalement les macrophages et PNN. Dans le modèle CIA, le développement de l'arthrite est lent sur une période de trois semaines alors que pour le K/BxN-STA, l'arthrite est rapide et plus agressive se développant au bout de 48 heures,

ce qui laisse penser que les MSC sont incapables de la contrôler par voie systémique (36,323). De plus, en comparant dans la littérature les concentrations de cytokines entre les deux modèles, nous avons observé des concentrations peu élevées de TNF, IL-6, IFN- $\gamma$  dans le sérum du modèle K/BxN au pic inflammatoire (10-15 pg/ml) comparé à des concentrations de l'ordre de 100 à 200 pg/ml au pic inflammatoire du modèle CIA (334,364,377). Afin donc de confirmer les concentrations rapportées dans la littérature, il serait important de quantifier les cytokines inflammatoires dans le sérum de notre modèle K/BxN-STA.

Nous avons, par la suite, exploré différentes options dans le but d'améliorer l'effet des ADSC et avons finalement eu recours à des injections IA. L'injection par voie IA améliore en effet la capacité des ADSC à contrôler les scores cliniques de l'arthrite. Nous spéculons que cette amélioration du score clinique, malgré l'utilisation du même protocole que celui utilisé par voie IP (J3 et J5), serait due à l'adressage direct des ADSC à l'articulation inflammatoire ce qui a pu en effet stimuler leur potentiel. Cette hypothèse est appuyée par une étude menée par Brines *et al.* qui a montré des concentrations peu élevées de cytokines inflammatoires au niveau du sérum des souris dans le modèle K/BxN-STA : IL-6 (7 pg/mL), IL-1 $\beta$  (4 pg/mL), TNF (15 pg/mL), IFN- $\gamma$  (16 pg/mL) contrairement à des concentrations beaucoup plus élevées au niveau de l'articulation : IL-6 (200 pg/mL), IL-1 $\beta$  (1000 pg/mL) et TNF (2500 pg/mL), ce qui pourrait en effet expliquer l'effet différentiel observé par les différentes voies d'injection (364).

De plus, une étude par Yan *et al.* a également montré que l'injection IA des MSC au niveau des genoux inhibe la sévérité de l'arthrite dans le modèle CIA et a même un effet bénéfique systémique par l'inhibition du TNF, IFN- $\gamma$  et IL-17 dans le sérum des souris (378). L'effet inhibiteur observé est conforme à une autre étude par Kehoe *et al.* employant des injections IA dans le modèle AIA qui a également montré une amélioration de la sévérité de l'arthrite (330).

Fonctionnellement, nous avons démontré une tendance vers l'inhibition des macrophages M1 pro-inflammatoires bien que cet effet ne fût pas significatif puisque l'effet des ADSC était transitoire et avait disparu au J10, le même jour où les pattes ont été prélevées. Pour cela, il serait important de répéter cette expérience avec un prélèvement plus précoce afin de confirmer

le potentiel immunomodulateur des ADSC au niveau des articulations. De plus, il serait intéressant de répéter les injections par voie IA aux différents « timing » évalués précédemment par les injections IP afin de comparer l'effet des deux voies d'administration.

## **Conclusion**

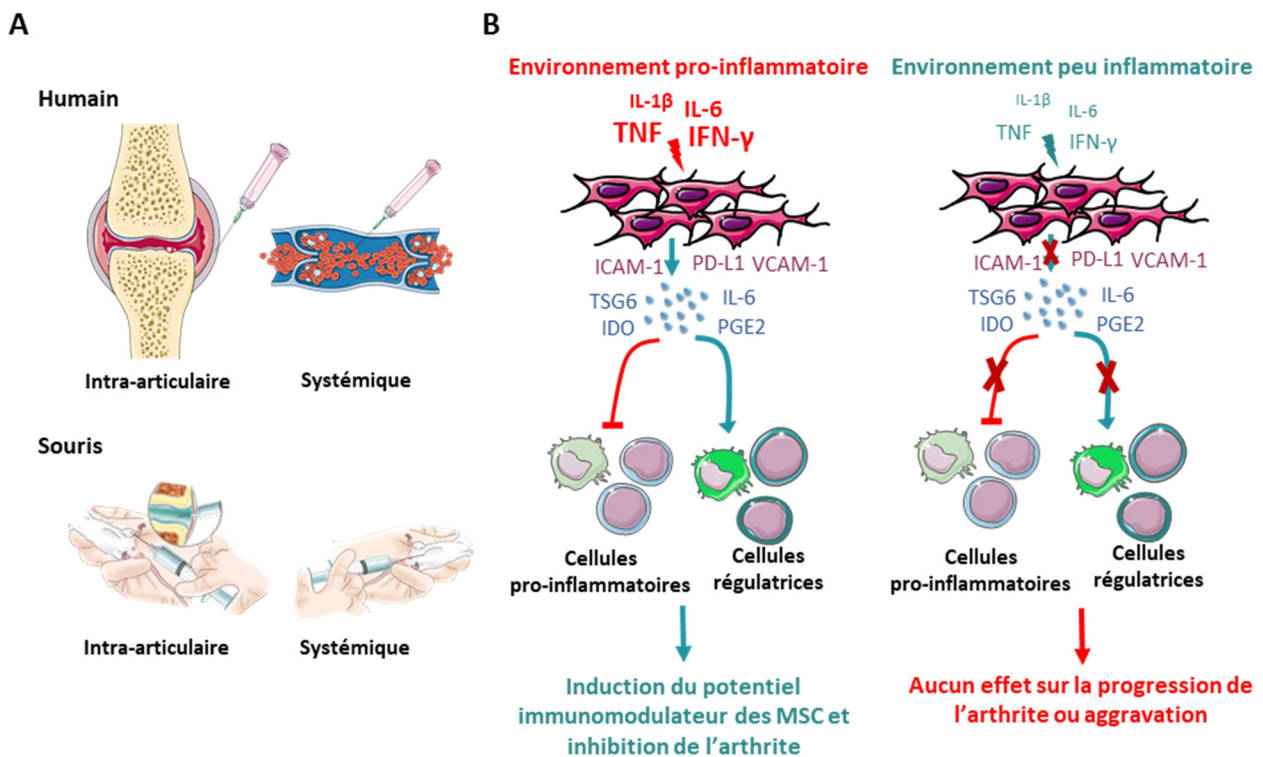
Malgré le progrès énorme réalisé dans le domaine de la thérapie cellulaire, la traduction des études translationnelles en application clinique est toujours difficile. Elle fait preuve de plusieurs limitations à surmonter, surtout avec les inconsistances rapportées dans les modèles d'arthrite expérimentale et les essais cliniques (335,379). Nous avons bien montré que les liquides articulaires inflammatoires pourraient en effet induire considérablement le potentiel immunomodulateur des ADSC et cela a été traduit dans un modèle *in vivo* où l'injection IA améliore l'efficacité des ADSC à contrôler l'arthrite. Cependant, que ce soit par voie IA ou par voie systémique, tant que le statut inflammatoire de l'hôte n'est pas suffisamment inflammatoire, les ADSC n'auront pas l'effet attendu. Ainsi, une meilleure compréhension de l'immunobiologie des MSC et leur comportement dans différents microenvironnements ainsi que les interactions complexes entre les MSC et les cellules immunitaires est primordial pour pouvoir maximiser leur potentiel chez chaque individu puisque, comme expliqué précédemment, l'hétérogénéité des patients et du stade de la PR sont des variables qui devront être prise en considération.

D'autre part, comme les stratégies proposées actuellement pour améliorer le potentiel des MSC ne sont toujours pas employées en clinique en raison de questions sur leurs sécurité et effets secondaires (à savoir le pré-conditionnement des cellules avant injection, l'utilisation du sécrétome, les modifications génétiques), il serait important de se focaliser à l'adressage des cellules à un milieu pro-inflammatoire. En effet, le statut inflammatoire du receveur pourrait affecter positivement le potentiel des MSC et cela a été montré dans un essai clinique chez des patients atteints de SLE qui a mis en évidence une meilleure réponse au traitement par MSC avec des concentrations d'IFN- $\gamma$  sériques élevées (380). Une première étape serait donc d'établir des clairs biomarqueurs prédictifs du potentiel des MSC comme suggéré par la quantification de PPAR $\beta/\gamma$  chez les MSC ou la quantification de l'expression de cytokines inflammatoires ou de



miRNA au niveau des patients receveurs (306,376). En se basant sur notre étude, une quantification du TNF dans le liquide articulaire avant les injections serait une approche possible pour choisir de bons candidats et garantir l'effet thérapeutique des ADSC.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats met en avant le rôle crucial de l'inflammation dans l'amélioration des effets thérapeutiques des MSC et suggère leur adressage direct aux sites inflammatoires qui stimulent leur potentiel immunomodulateur et maximisent leur intérêt clinique (**Figure 38**).



**Figure 38. L'adressage des MSC aux sites inflammatoires maximisent leur intérêt clinique. (A)** Chez l'homme ou la souris, l'efficacité des MSC par des injections intra-articulaires et systémiques dépend de l'environnement inflammatoire. **(B)** Un environnement pro-inflammatoire induit les facteurs impliqués dans l'inhibition des cellules immunitaires pro-inflammatoires et l'induction des cellules régulatrices par les MSC, inhibant ainsi l'arthrite, tandis qu'un environnement peu inflammatoire supprime l'effet des MSC et pourrait même résulter en l'aggravation de l'arthrite.

---

# Bibliographie

---

1. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jun;7(6):429–42.
2. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2002;4(Suppl 3):S265–72.
3. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):356–61.
4. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*. 2017 21;46(2):183–96.
5. van Onna M, Boonen A. The challenging interplay between rheumatoid arthritis, ageing and comorbidities. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016 Apr 26;17:184.
6. Ruffing V, Bingham CO. Rheumatoid Arthritis Symptoms [Internet]. Johns Hopkins Arthritis Center. [cited 2019 Oct 10]. Available from: <https://www.hopkinsarthritis.org/arthritis-info/rheumatoid-arthritis/ra-symptoms/>
7. Railton D. Seronegative rheumatoid arthritis: Symptoms, diagnosis, and treatment [Internet]. Medical News Today. [cited 2019 Oct 10]. Available from: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/315580.php>
8. Klareskog L, Lorentzen J, Padyukov L, Alfredsson L. Genes and environment in arthritis: can RA be prevented? *Arthritis Res*. 2002;4(Suppl 3):S31–6.
9. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum*. 2000 Jan;43(1):30–7.
10. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1987 Nov;30(11):1205–13.
11. Hinks A, Barton A, John S, Bruce I, Hawkins C, Griffiths CEM, et al. Association between the PTPN22 gene and rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in a UK population: further support that PTPN22 is an autoimmunity gene. *Arthritis Rheum*. 2005 Jun;52(6):1694–9.
12. Lei C, Dongqing Z, Yeqing S, Oaks MK, Lishan C, Jianzhong J, et al. Association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis in Chinese Han population. *Eur J Hum Genet*. 2005 Jul;13(7):823–8.
13. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2007 Sep 6;357(10):977–86.
14. Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiko S, Sawada T, Suzuki M, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2003 Aug;34(4):395–402.
15. Maalej A, Hamad MB, Rebaï A, Teixeira VH, Bahloul Z, Marzouk S, et al. Association of IRF5 gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in a Tunisian population. *Scand J Rheumatol*. 2008 Dec;37(6):414–8.

16. Liu Y, Aryee MJ, Padyukov L, Fallin MD, Hesselberg E, Runarsson A, et al. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat Biotechnol*. 2013 Feb;31(2):142–7.
17. Stanczyk J, Ospelt C, Karouzakis E, Filer A, Raza K, Kolling C, et al. Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis Rheum*. 2011 Feb;63(2):373–81.
18. Darrah E, Andrade F. Rheumatoid arthritis and citrullination. *Curr Opin Rheumatol*. 2018 Jan;30(1):72–8.
19. Konig MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2016 14;8(369):369ra176.
20. Arvikar SL, Collier DS, Fisher MC, Unizony S, Cohen GL, McHugh G, et al. Clinical correlations with *Porphyromonas gingivalis* antibody responses in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(5):R109.
21. Saal JG, Krimmel M, Steidle M, Gerneth F, Wagner S, Fritz P, et al. Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope. *Arthritis Rheum*. 1999 Jul;42(7):1485–96.
22. Pierer M, Rothe K, Quandt D, Schulz A, Rossol M, Scholz R, et al. Association of anticytomegalovirus seropositivity with more severe joint destruction and more frequent joint surgery in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012 Jun;64(6):1740–9.
23. Pruijn GJM. Citrullination and carbamylation in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Front Immunol*. 2015;6:192.
24. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010 Sep;62(9):2569–81.
25. Fransen J, Creemers MCW, Van Riel PLCM. Remission in rheumatoid arthritis: agreement of the disease activity score (DAS28) with the ARA preliminary remission criteria. *Rheumatology (Oxford)*. 2004 Oct;43(10):1252–5.
26. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995 Jan;38(1):44–8.
27. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 08;4:18001.
28. Wang F, Chen F-F, Gao W-B, Wang H-Y, Zhao N-W, Xu M, et al. Identification of citrullinated peptides in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis using LC-MALDI-TOF/TOF. *Clin Rheumatol*. 2016 Sep;35(9):2185–94.

29. Foulquier C, Sebbag M, Clavel C, Chapuy-Regaud S, Al Badine R, Méchin M-C, et al. Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis Rheum*. 2007 Nov;56(11):3541–53.
30. Snir O, Widhe M, von Spee C, Lindberg J, Padyukov L, Lundberg K, et al. Multiple antibody reactivities to citrullinated antigens in sera from patients with rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1 alleles. *Ann Rheum Dis*. 2009 May;68(5):736–43.
31. Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Jan;6(1):75–92.
32. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011 Dec 8;365(23):2205–19.
33. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw*. 2018 Aug;18(4):e27.
34. Rosin DL, Okusa MD. Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Mar;22(3):416–25.
35. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197–216.
36. Christensen AD, Haase C, Cook AD, Hamilton JA. K/BxN Serum-Transfer Arthritis as a Model for Human Inflammatory Arthritis. *Front Immunol*. 2016;7:213.
37. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014 Oct;10(10):593–601.
38. Cecchi I, Arias de la Rosa I, Menegatti E, Roccatello D, Collantes-Estevez E, Lopez-Pedrerá C, et al. Neutrophils: Novel key players in Rheumatoid Arthritis. Current and future therapeutic targets. *Autoimmun Rev*. 2018 Nov;17(11):1138–49.
39. Eggleton P, Wang L, Penhallow J, Crawford N, Brown KA. Differences in oxidative response of subpopulations of neutrophils from healthy subjects and patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1995 Nov;54(11):916–23.
40. Derouet M, Thomas L, Cross A, Moots RJ, Edwards SW. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J Biol Chem*. 2004 Jun 25;279(26):26915–21.
41. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013 Mar 27;5(178):178ra40.
42. Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2001 Aug 1;167(3):1601–8.
43. Eklund KK. Mast cells in the pathogenesis of rheumatic diseases and as potential targets for anti-rheumatic therapy. *Immunol Rev*. 2007 Jun;217:38–52.

44. Thomas R, Davis LS, Lipsky PE. Rheumatoid synovium is enriched in mature antigen-presenting dendritic cells. *J Immunol*. 1994 Mar 1;152(5):2613–23.
45. Chen S-J, Lin G-J, Chen J-W, Wang K-C, Tien C-H, Hu C-F, et al. Immunopathogenic Mechanisms and Novel Immune-Modulated Therapies in Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 16;20(6).
46. Page G, Lebecque S, Miossec P. Anatomic localization of immature and mature dendritic cells in an ectopic lymphoid organ: correlation with selective chemokine expression in rheumatoid synovium. *J Immunol*. 2002 May 15;168(10):5333–41.
47. Manh T-PV, Alexandre Y, Baranek T, Crozat K, Dalod M. Plasmacytoid, conventional, and monocyte-derived dendritic cells undergo a profound and convergent genetic reprogramming during their maturation. *Eur J Immunol*. 2013 Jul;43(7):1706–15.
48. Flórez-Grau G, Zubizarreta I, Cabezón R, Villoslada P, Benitez-Ribas D. Tolerogenic Dendritic Cells as a Promising Antigen-Specific Therapy in the Treatment of Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica From Preclinical to Clinical Trials. *Front Immunol*. 2018;9:1169.
49. Nanki T, Urasaki Y, Imai T, Nishimura M, Muramoto K, Kubota T, et al. Inhibition of fractalkine ameliorates murine collagen-induced arthritis. *J Immunol*. 2004 Dec 1;173(11):7010–6.
50. Stoop JN, Harry RA, von Delwig A, Isaacs JD, Robinson JH, Hilkens CMU. Therapeutic effect of tolerogenic dendritic cells in established collagen-induced arthritis is associated with a reduction in Th17 responses. *Arthritis Rheum*. 2010 Dec;62(12):3656–65.
51. Falgarone G, Jaen O, Boissier M-C. Role for innate immunity in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2005 Jan;72(1):17–25.
52. Takaki-Kuwahara A, Arinobu Y, Miyawaki K, Yamada H, Tsuzuki H, Irino K, et al. CCR6+ group 3 innate lymphoid cells accumulate in inflamed joints in rheumatoid arthritis and produce Th17 cytokines. *Arthritis Res Ther*. 2019 Aug 30;21(1):198.
53. Wijbrandts CA, Tak PP. Prediction of Response to Targeted Treatment in Rheumatoid Arthritis. *Mayo Clin Proc*. 2017;92(7):1129–43.
54. Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Johnson B, Evanoff HL, Haines GK, et al. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1992 Sep;90(3):772–9.
55. Nanki T, Imai T, Kawai S. Fractalkine/CX3CL1 in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2017 May;27(3):392–7.
56. McInnes IB, Leung BP, Field M, Wei XQ, Huang FP, Sturrock RD, et al. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med*. 1996 Oct 1;184(4):1519–24.
57. Bauermeister K, Burger M, Almanasreh N, Knopf HP, Schumann RR, Schollmeyer P, et al. Distinct regulation of IL-8 and MCP-1 by LPS and interferon-gamma-treated human peritoneal macrophages. *Nephrol Dial Transplant*. 1998 Jun;13(6):1412–9.

58. Tetlow LC, Lees M, Ogata Y, Nagase H, Woolley DE. Differential expression of gelatinase B (MMP-9) and stromelysin-1 (MMP-3) by rheumatoid synovial cells in vitro and in vivo. *Rheumatol Int.* 1993;13(2):53–9.
59. Maruotti N, Annese T, Cantatore FP, Ribatti D. Macrophages and angiogenesis in rheumatic diseases. *Vascular Cell.* 2013 Jun 1;5(1):11.
60. Haringman JJ, Gerlag DM, Zwinderman AH, Smeets TJM, Kraan MC, Baeten D, et al. Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005 Jun;64(6):834–8.
61. Solomon S, Rajasekaran N, Jeisy-Walder E, Snapper SB, Illges H. A crucial role for macrophages in the pathology of K/B x N serum-induced arthritis. *Eur J Immunol.* 2005 Oct;35(10):3064–73.
62. Misharin AV, Cuda CM, Saber R, Turner JD, Gierut AK, Haines GK, et al. Nonclassical Ly6C(-) monocytes drive the development of inflammatory arthritis in mice. *Cell Rep.* 2014 Oct 23;9(2):591–604.
63. Brunet A, LeBel M, Egarnes B, Paquet-Bouchard C, Lessard A-J, Brown JP, et al. NR4A1-dependent Ly6Clow monocytes contribute to reducing joint inflammation in arthritic mice through Treg cells. *Eur J Immunol.* 2016;46(12):2789–800.
64. Udalova IA, Mantovani A, Feldmann M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016 Aug;12(8):472–85.
65. Kennedy A, Fearon U, Veale DJ, Godson C. Macrophages in synovial inflammation. *Front Immunol.* 2011;2:52.
66. Suttles J, Stout RD. Macrophage CD40 signaling: a pivotal regulator of disease protection and pathogenesis. *Semin Immunol.* 2009 Oct;21(5):257–64.
67. Trombetta AC, Soldano S, Contini P, Tomatis V, Ruaro B, Paolino S, et al. A circulating cell population showing both M1 and M2 monocyte/macrophage surface markers characterizes systemic sclerosis patients with lung involvement. *Respir Res.* 2018 Sep 24;19(1):186.
68. Wu Y, Liu J, Feng X, Yang P, Xu X, Hsu H-C, et al. Synovial fibroblasts promote osteoclast formation by RANKL in a novel model of spontaneous erosive arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005 Oct;52(10):3257–68.
69. Ambarus CA, Noordenbos T, de Hair MJH, Tak PP, Baeten DLP. Intimal lining layer macrophages but not synovial sublining macrophages display an IL-10 polarized-like phenotype in chronic synovitis. *Arthritis Res Ther.* 2012 Apr 11;14(2):R74.
70. Allen JB, Wong HL, Costa GL, Bienkowski MJ, Wahl SM. Suppression of monocyte function and differential regulation of IL-1 and IL-1ra by IL-4 contribute to resolution of experimental arthritis. *J Immunol.* 1993 Oct 15;151(8):4344–51.
71. Suzuki Y, Shirai M, Asada K, Yasui H, Karayama M, Hozumi H, et al. Macrophage mannose receptor, CD206, predict prognosis in patients with pulmonary tuberculosis. *Sci Rep.* 2018 03;8(1):13129.
72. Pastore M, Grimaudo S, Pipitone RM, Lori G, Raggi C, Petta S, et al. Role of Myeloid-Epithelial-Reproductive Tyrosine Kinase and Macrophage Polarization in the Progression of Atherosclerotic Lesions Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Front Pharmacol.* 2019;10:604.

73. Culemann S, Grüneboom A, Nicolás-Ávila JÁ, Weidner D, Lämmle KF, Rothe T, et al. Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint. *Nature*. 2019 Aug;572(7771):670–5.
74. Chen Z, Klein T, Murray RZ, Crawford R, Chang J, Wu C, et al. Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials. *Materials Today*. 2016 Jul 1;19(6):304–21.
75. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13.
76. den Haan JMM, Arens R, van Zelm MC. The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunol Lett*. 2014 Dec;162(2 Pt B):103–12.
77. Smolen JS, Aletaha D, Redlich K. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data? *Nat Rev Rheumatol*. 2012 13;8(4):235–43.
78. Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessière C, Girbal E, Durieux JJ, et al. The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*. 1995 Jun;95(6):2672–9.
79. Nielen MMJ, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MHMT, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum*. 2004 Feb;50(2):380–6.
80. Bugatti S, Vitolo B, Caporali R, Montecucco C, Manzo A. B cells in rheumatoid arthritis: from pathogenic players to disease biomarkers. *Biomed Res Int*. 2014;2014:681678.
81. Lanzavecchia A. Antigen uptake and accumulation in antigen-specific B cells. *Immunol Rev*. 1987 Oct;99:39–51.
82. Choi Y, Woo KM, Ko SH, Lee YJ, Park SJ, Kim HM, et al. Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8(+) T cells. *Eur J Immunol*. 2001 Jul;31(7):2179–88.
83. Park M-K, Jung YO, Lee S-Y, Lee SH, Heo Y-J, Kim E-K, et al. Amelioration of autoimmune arthritis by adoptive transfer of Foxp3-expressing regulatory B cells is associated with the Treg/Th17 cell balance. *J Transl Med*. 2016 28;14(1):191.
84. Carvalheiro H, da Silva JAP, Souto-Carneiro MM. Potential roles for CD8(+) T cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2013 Jan;12(3):401–9.
85. Kang YM, Zhang X, Wagner UG, Yang H, Beckenbaugh RD, Kurtin PJ, et al. CD8 T cells are required for the formation of ectopic germinal centers in rheumatoid synovitis. *J Exp Med*. 2002 May 20;195(10):1325–36.
86. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S33–40.
87. Jankovic D, Liu Z, Gause WC. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol*. 2001 Aug;22(8):450–7.



88. Schulze-Koops H, Kalden JR. The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2001 Dec;15(5):677–91.
89. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*. 2010 Oct;162(1):1–11.
90. Dolhain RJ, van der Heiden AN, ter Haar NT, Breedveld FC, Miltenburg AM. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1996 Dec;39(12):1961–9.
91. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1123–32.
92. Chemin K, Gerstner C, Malmström V. Effector Functions of CD4<sup>+</sup> T Cells at the Site of Local Autoimmune Inflammation-Lessons From Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2019;10:353.
93. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*. 2007 Jun;8(6):639–46.
94. van Hamburg JP, Asmawidjaja PS, Davelaar N, Mus AMC, Colin EM, Hazes JMW, et al. Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production. *Arthritis Rheum*. 2011 Jan;63(1):73–83.
95. Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science*. 2011 Apr 1;332(6025):65–8.
96. Merola JF, Espinoza LR, Fleischmann R. Distinguishing rheumatoid arthritis from psoriatic arthritis. *RMD Open*. 2018;4(2):e000656.
97. Li G, Zhang Y, Qian Y, Zhang H, Guo S, Sunagawa M, et al. Interleukin-17A promotes rheumatoid arthritis synoviocytes migration and invasion under hypoxia by increasing MMP2 and MMP9 expression through NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$  pathway. *Mol Immunol*. 2013 Mar;53(3):227–36.
98. Pickens SR, Volin MV, Mandelin AM, Kolls JK, Pope RM, Shahrara S. IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2010 Mar 15;184(6):3233–41.
99. Pavlovic V, Dimic A, Milenkovic S, Krtinic D. Serum levels of IL-17, IL-4, and INF $\gamma$  in Serbian patients with early rheumatoid arthritis. *J Res Med Sci*. 2014 Jan;19(1):18–22.
100. Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol*. 2003 Dec 1;171(11):6173–7.
101. Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, Lu Q, Yoshimura A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol*. 2016;37(11):803–11.
102. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):330–6.

103. Chen X, Oppenheim JJ. Resolving the identity myth: key markers of functional CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Int Immunopharmacol*. 2011 Oct;11(10):1489–96.
104. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med*. 2013 Jun;19(6):739–46.
105. Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest*. 1996 Jul 1;98(1):70–7.
106. Cao D, Vollenhoven R van, Klareskog L, Trollmo C, Malmström V. CD25<sup>bright</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther*. 2004;6(4):R335–46.
107. Samson M, Audia S, Janikashvili N, Ciudad M, Trad M, Fraszczak J, et al. Brief report: inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012 Aug;64(8):2499–503.
108. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J Exp Med*. 2007 Jan 22;204(1):33–9.
109. Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C, Ehrenstein MR. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Dec 9;105(49):19396–401.
110. Chowdhury K, Kumar U, Das S, Chaudhuri J, Kumar P, Kanjilal M, et al. Synovial IL-9 facilitates neutrophil survival, function and differentiation of Th17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2018 30;20(1):18.
111. Miyazaki Y, Nakayamada S, Kubo S, Nakano K, Iwata S, Miyagawa I, et al. Th22 Cells Promote Osteoclast Differentiation via Production of IL-22 in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2018;9:2901.
112. Niu Q, Huang Z-C, Wu X-J, Jin Y-X, An Y-F, Li Y-M, et al. Enhanced IL-6/phosphorylated STAT3 signaling is related to the imbalance of circulating T follicular helper/T follicular regulatory cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2018 29;20(1):200.
113. Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, Slowikowski K, Fonseka CY, Liu Y, et al. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature*. 2017 01;542(7639):110–4.
114. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*. 2010 Jan;233(1):233–55.
115. Swann DA, Radin EL, Nazimiec M, Weisser PA, Curran N, Lewinnek G. Role of hyaluronic acid in joint lubrication. *Ann Rheum Dis*. 1974 Jul;33(4):318–26.
116. Mor A, Abramson SB, Pillinger MH. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol*. 2005 May;115(2):118–28.
117. Li X, Makarov SS. An essential role of NF-kappaB in the “tumor-like” phenotype of arthritic synoviocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Nov 14;103(46):17432–7.

118. Croft AP, Campos J, Jansen K, Turner JD, Marshall J, Attar M, et al. Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis. *Nature*. 2019 Jun;570(7760):246–51.
119. Wynn TA. Two types of fibroblast drive arthritis. *Nature*. 2019 Jun;570(7760):169–70.
120. Uzan B, Ea H-K, Launay J-M, Garel J-M, Champy R, Cressent M, et al. A critical role for adrenomedullin-calcitonin receptor-like receptor in regulating rheumatoid fibroblast-like synoviocyte apoptosis. *J Immunol*. 2006 May 1;176(9):5548–58.
121. Tolboom TCA, Pieterman E, van der Laan WH, Toes REM, Huidekoper AL, Nelissen RGHH, et al. Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10. *Ann Rheum Dis*. 2002 Nov;61(11):975–80.
122. Palmer CD, Mutch BE, Page TH, Horwood NJ, Foxwell BMJ. Bmx regulates LPS-induced IL-6 and VEGF production via mRNA stability in rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Jun 13;370(4):599–602.
123. Zhang F, Wei K, Slowikowski K, Fonseka CY, Rao DA, Kelly S, et al. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol*. 2019;20(7):928–42.
124. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Jan;9(1):24–33.
125. Lewis MJ, Barnes MR, Blighe K, Goldmann K, Rana S, Hackney JA, et al. Molecular Portraits of Early Rheumatoid Arthritis Identify Clinical and Treatment Response Phenotypes. *Cell Rep*. 2019 Aug 27;28(9):2455–2470.e5.
126. Hui AY, McCarty WJ, Masuda K, Firestein GS, Sah RL. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2012 Feb;4(1):15–37.
127. Ropes MW, Rossmeisl EC, Bauer W. THE ORIGIN AND NATURE OF NORMAL HUMAN SYNOVIAL FLUID. *J Clin Invest*. 1940 Nov;19(6):795–9.
128. Wright HL, Bucknall RC, Moots RJ, Edwards SW. Analysis of SF and plasma cytokines provides insights into the mechanisms of inflammatory arthritis and may predict response to therapy. *Rheumatology (Oxford)*. 2012 Mar;51(3):451–9.
129. Krey PR, Bailen DA. Synovial fluid leukocytosis. A study of extremes. *Am J Med*. 1979 Sep;67(3):436–42.
130. Al-Shakarchi I, Coakley G. Synovial fluid tests. *Medicine*. 2014 Apr 1;42(4):202–4.
131. Church LD, Filer AD, Hidalgo E, Howlett KA, Thomas AMC, Rapecki S, et al. Rheumatoid synovial fluid interleukin-17-producing CD4 T cells have abundant tumor necrosis factor-alpha co-expression, but little interleukin-22 and interleukin-23R expression. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(5):R184.
132. Yoon BR, Yoo S-J, Choi Y ho, Chung Y-H, Kim J, Yoo IS, et al. Functional phenotype of synovial monocytes modulating inflammatory T-cell responses in rheumatoid arthritis (RA). *PLoS ONE*. 2014;9(10):e109775.

133. Lettesjö H, Nordström E, Ström H, Nilsson B, Glinghammar B, Dahlstedt L, et al. Synovial fluid cytokines in patients with rheumatoid arthritis or other arthritic lesions. *Scand J Immunol*. 1998 Sep;48(3):286–92.
134. McInnes IB, Buckley CD, Isaacs JD. Cytokines in rheumatoid arthritis - shaping the immunological landscape. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Jan;12(1):63–8.
135. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest*. 1999 May;103(9):1345–52.
136. Boissier M-C, Semerano L, Challal S, Saldenbergh-Kermanac'h N, Falgarone G. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J Autoimmun*. 2012 Sep;39(3):222–8.
137. Choi Y, Arron JR, Townsend MJ. Promising bone-related therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2009 Oct;5(10):543–8.
138. Ritchlin CT. Mechanisms of erosion in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2004 Jul;31(7):1229–37.
139. Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, et al. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med*. 1999 Dec 20;190(12):1741–54.
140. Gravalles EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E, et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum*. 2000 Feb;43(2):250–8.
141. Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, et al. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology*. 2000 Nov;141(11):3956–64.
142. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(3):224.
143. Otero M, Goldring MB. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(5):220.
144. Arner EC. Aggrecanase-mediated cartilage degradation. *Curr Opin Pharmacol*. 2002 Jun;2(3):322–9.
145. Catterall JB, Carrère S, Koshy PJ, Degnan BA, Shingleton WD, Brinckerhoff CE, et al. Synergistic induction of matrix metalloproteinase 1 by interleukin-1alpha and oncostatin M in human chondrocytes involves signal transducer and activator of transcription and activator protein 1 transcription factors via a novel mechanism. *Arthritis Rheum*. 2001 Oct;44(10):2296–310.
146. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016 Oct 22;388(10055):2023–38.
147. Sundy JS. COX-2 inhibitors in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2001 Feb;3(1):86–91.
148. Buttgerit F, Bijlsma JW. Glucocorticoids in rheumatoid arthritis: the picture is shaping up. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(11):1785–7.

149. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis*. 2017 Jun;76(6):960–77.
150. Scallon B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song X-Y, Shealy D, et al. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 May;301(2):418–26.
151. Burmester GR, Mariette X, Montecucco C, Monteagudo-Sáez I, Malaise M, Tzioufas AG, et al. Adalimumab alone and in combination with disease-modifying antirheumatic drugs for the treatment of rheumatoid arthritis in clinical practice: the Research in Active Rheumatoid Arthritis (ReAct) trial. *Ann Rheum Dis*. 2007 Jun;66(6):732–9.
152. Smolen JS, Kay J, Matteson EL, Landewé R, Hsia EC, Xu S, et al. Insights into the efficacy of golimumab plus methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis who discontinued prior anti-tumour necrosis factor therapy: post-hoc analyses from the GO-AFTER study. *Ann Rheum Dis*. 2014 Oct;73(10):1811–8.
153. Fleischmann R, Vencovsky J, van Vollenhoven RF, Borenstein D, Box J, Coteur G, et al. Efficacy and safety of certolizumab pegol monotherapy every 4 weeks in patients with rheumatoid arthritis failing previous disease-modifying antirheumatic therapy: the FAST4WARD study. *Ann Rheum Dis*. 2009 Jun;68(6):805–11.
154. Neregård P, Krishnamurthy A, Revu S, Engström M, af Klint E, Catrina AI. Etanercept decreases synovial expression of tumour necrosis factor- $\alpha$  and lymphotoxin- $\alpha$  in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2014;43(2):85–90.
155. Degboé Y, Rauwel B, Baron M, Boyer J-F, Ruysen-Witrand A, Constantin A, et al. Polarization of Rheumatoid Macrophages by TNF Targeting Through an IL-10/STAT3 Mechanism. *Front Immunol*. 2019;10:3.
156. Nguyen DX, Ehrenstein MR. Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF-TNF-RII binding in rheumatoid arthritis. *J Exp Med*. 2016 27;213(7):1241–53.
157. Paleolog EM, Young S, Stark AC, McCloskey RV, Feldmann M, Maini RN. Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1998 Jul;41(7):1258–65.
158. Redlich K, Görtz B, Hayer S, Zwerina J, Doerr N, Kostenuik P, et al. Repair of local bone erosions and reversal of systemic bone loss upon therapy with anti-tumor necrosis factor in combination with osteoprotegerin or parathyroid hormone in tumor necrosis factor-mediated arthritis. *Am J Pathol*. 2004 Feb;164(2):543–55.
159. Miller EA, Ernst JD. Anti-TNF immunotherapy and tuberculosis reactivation: another mechanism revealed. *J Clin Invest*. 2009 May;119(5):1079–82.
160. Pesce B, Soto L, Sabugo F, Wurmman P, Cuchacovich M, López MN, et al. Effect of interleukin-6 receptor blockade on the balance between regulatory T cells and T helper type 17 cells in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Immunol*. 2013 Mar;171(3):237–42.

161. Smolen JS, Avila JCM, Aletaha D. Tocilizumab inhibits progression of joint damage in rheumatoid arthritis irrespective of its anti-inflammatory effects: disassociation of the link between inflammation and destruction. *Ann Rheum Dis*. 2012 May;71(5):687–93.
162. Pawar A, Desai RJ, Solomon DH, Santiago Ortiz AJ, Gale S, Bao M, et al. Risk of serious infections in tocilizumab versus other biologic drugs in patients with rheumatoid arthritis: a multidatabase cohort study. *Ann Rheum Dis*. 2019 Apr;78(4):456–64.
163. Kawashiri S, Kawakami A, Yamasaki S, Imazato T, Iwamoto N, Fujikawa K, et al. Effects of the anti-interleukin-6 receptor antibody, tocilizumab, on serum lipid levels in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2011 Apr;31(4):451–6.
164. Moots RJ, Sebba A, Rigby W, Ostor A, Porter-Brown B, Donaldson F, et al. Effect of tocilizumab on neutrophils in adult patients with rheumatoid arthritis: pooled analysis of data from phase 3 and 4 clinical trials. *Rheumatology (Oxford)*. 2017 01;56(4):541–9.
165. Cohen SB. The use of anakinra, an interleukin-1 receptor antagonist, in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2004 May;30(2):365–80, vii.
166. Bonelli M, Göschl L, Blüml S, Karonitsch T, Hirahara K, Ferner E, et al. Abatacept (CTLA-4Ig) treatment reduces T cell apoptosis and regulatory T cell suppression in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2016 Apr;55(4):710–20.
167. Axmann R, Herman S, Zaiss M, Franz S, Polzer K, Zwerina J, et al. CTLA-4 directly inhibits osteoclast formation. *Ann Rheum Dis*. 2008 Nov;67(11):1603–9.
168. McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2017 10;389(10086):2328–37.
169. Salliot C, Dougados M, Gossec L. Risk of serious infections during rituximab, abatacept and anakinra treatments for rheumatoid arthritis: meta-analyses of randomised placebo-controlled trials. *Ann Rheum Dis*. 2009 Jan;68(1):25–32.
170. Szodoray P, Alex P, Dandapani V, Nakken B, Pesina J, Kim X, et al. Apoptotic effect of rituximab on peripheral blood B cells in rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol*. 2004 Aug;60(1–2):209–18.
171. Edwards JCW, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2004 Jun 17;350(25):2572–81.
172. Boyle DL, Soma K, Hodge J, Kavanaugh A, Mandel D, Mease P, et al. The JAK inhibitor tofacitinib suppresses synovial JAK1-STAT signalling in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015 Jun;74(6):1311–6.
173. Genovese MC, Kremer J, Zamani O, Ludivico C, Krogulec M, Xie L, et al. Baricitinib in Patients with Refractory Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. 2016 Mar 31;374(13):1243–52.
174. Maeshima K, Yamaoka K, Kubo S, Nakano K, Iwata S, Saito K, et al. The JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of interferon- $\gamma$  and interleukin-17 production by human CD4<sup>+</sup> T cells. *Arthritis Rheum*. 2012 Jun;64(6):1790–8.

175. Kunwar S, Devkota AR, Ghimire DKC. Fostamatinib, an oral spleen tyrosine kinase inhibitor, in the treatment of rheumatoid arthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Rheumatol Int.* 2016 Aug;36(8):1077–87.
176. Cohen SB, Cheng T-T, Chindalore V, Damjanov N, Burgos-Vargas R, Delora P, et al. Evaluation of the efficacy and safety of pamapimod, a p38 MAP kinase inhibitor, in a double-blind, methotrexate-controlled study of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009 Feb;60(2):335–44.
177. Banham-Hall E, Clatworthy MR, Okkenhaug K. The Therapeutic Potential for PI3K Inhibitors in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Open Rheumatol J.* 2012;6:245–58.
178. Makarov SS. NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis Res.* 2001;3(4):200–6.
179. Biswas M, Kumar SRP, Terhorst C, Herzog RW. Gene Therapy With Regulatory T Cells: A Beneficial Alliance. *Front Immunol.* 2018;9:554.
180. Sun G, Hou Y, Gong W, Liu S, Li J, Yuan Y, et al. Adoptive Induced Antigen-Specific Treg Cells Reverse Inflammation in Collagen-Induced Arthritis Mouse Model. *Inflammation.* 2018 Mar;41(2):485–95.
181. Wright GP, Notley CA, Xue S-A, Bendle GM, Holler A, Schumacher TN, et al. Adoptive therapy with redirected primary regulatory T cells results in antigen-specific suppression of arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009 Nov 10;106(45):19078–83.
182. Ahmed MS, Bae Y-S. Dendritic Cell-based Immunotherapy for Rheumatoid Arthritis: from Bench to Bedside. *Immune Netw.* 2016 Feb;16(1):44–51.
183. Charbonnier L-M, van Duivenvoorde LM, Apparailly F, Cantos C, Han WGH, Noël D, et al. Immature dendritic cells suppress collagen-induced arthritis by in vivo expansion of CD49b+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2006 Sep 15;177(6):3806–13.
184. Benham H, Nel HJ, Law SC, Mehdi AM, Street S, Ramnorch N, et al. Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype-positive rheumatoid arthritis patients. *Sci Transl Med.* 2015 Jun 3;7(290):290ra87.
185. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term “stem cell.” *Cell Stem Cell.* 2007 Jun 7;1(1):35–8.
186. Kelly SJ. Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *J Exp Zool.* 1977 Jun;200(3):365–76.
187. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998 Nov 6;282(5391):1145–7.
188. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663–76.
189. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143–7.

190. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:35–71.
191. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Feb 26;10(1):68.
192. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968 Mar;6(2):230–47.
193. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970 Oct;3(4):393–403.
194. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991 Sep;9(5):641–50.
195. Berdasco M, Esteller M. DNA methylation in stem cell renewal and multipotency. *Stem Cell Research & Therapy.* 2011 Oct 31;2(5):42.
196. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315–7.
197. Docheva D, Haasters F, Schieker M. Mesenchymal Stem Cells and Their Cell Surface Receptors. *CRR.* 2008 Aug 1;4(3):155–60.
198. Witt R, Weigand A, Boos AM, Cai A, Dippold D, Boccaccini AR, et al. Mesenchymal stem cells and myoblast differentiation under HGF and IGF-1 stimulation for 3D skeletal muscle tissue engineering. *BMC Cell Biol.* 2017 28;18(1):15.
199. Szaraz P, Gratch YS, Iqbal F, Librach CL. In Vitro Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Functional Cardiomyocyte-like Cells. *J Vis Exp.* 2017 09;(126).
200. Morita Y, Yamashita T, Toku T, Ju Y. Optimization of differentiation time of mesenchymal-stem-cell to tenocyte under a cyclic stretching with a microgrooved culture membrane and selected measurement cells. *Acta Bioeng Biomech.* 2018;20(1):3–10.
201. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006 Jun 1;119(Pt 11):2204–13.
202. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 2006 May;24(5):1294–301.
203. Wu M, Zhang R, Zou Q, Chen Y, Zhou M, Li X, et al. Comparison of the Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from the Human Placenta and Umbilical Cord. *Sci Rep.* 2018 22;8(1):5014.
204. Hatakeyama A, Uchida S, Utsunomiya H, Tsukamoto M, Nakashima H, Nakamura E, et al. Isolation and Characterization of Synovial Mesenchymal Stem Cell Derived from Hip Joints: A Comparative Analysis with a Matched Control Knee Group. *Stem Cells Int.* 2017;2017:9312329.
205. Jorgenson KD, Hart DA, Krawetz R, Sen A. Production of Adult Human Synovial Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells in Stirred-Suspension Culture. *Stem Cells Int.* 2018;2018:8431053.



206. Dehm P, Prockop DJ. Synthesis and extrusion of collagen by freshly isolated cells from chick embryo tendon. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*. 1971 Jul 15;240(3):358–69.
207. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*. 2003 Dec;82(12):976–81.
208. Rossignoli F, Caselli A, Grisendi G, Piccinno S, Burns JS, Murgia A, et al. Isolation, characterization, and transduction of endometrial decidual tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood. *Biomed Res Int*. 2013;2013:901821.
209. Mattar P, Bieback K. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. *Front Immunol*. 2015;6:560.
210. Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. Adipose Tissue-Derived Multipotent Stromal Cells Have a Higher Immunomodulatory Capacity Than Their Bone Marrow-Derived Counterparts. *Stem Cells Transl Med*. 2013 Jun;2(6):455–63.
211. Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Gonçalves RM. Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-conditioning. *Front Immunol*. 2018 Dec 4;9:2837.
212. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*. 2014 Feb;21(2):216–25.
213. Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *STEM CELLS*. 2019;37(7):855–64.
214. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*. 2012 Jul 6;18(7):1028–40.
215. Usunier B, Benderitter M, Tamarat R, Chapel A. Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough. *Stem Cells Int*. 2014;2014:340257.
216. Dong L-H, Jiang Y-Y, Liu Y-J, Cui S, Xia C-C, Qu C, et al. The anti-fibrotic effects of mesenchymal stem cells on irradiated lungs via stimulating endogenous secretion of HGF and PGE2. *Sci Rep*. 2015 Mar 4;5:8713.
217. Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, Nagaya N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *FEBS Lett*. 2007 Aug 21;581(21):3961–6.
218. Tögel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 May;292(5):F1626-1635.
219. Singla DK, McDonald DE. Factors released from embryonic stem cells inhibit apoptosis of H9c2 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Sep;293(3):H1590-1595.

220. Block GJ, Ohkouchi S, Fung F, Frenkel J, Gregory C, Pochampally R, et al. Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells*. 2009 Mar;27(3):670–81.
221. He A, Jiang Y, Gui C, Sun Y, Li J, Wang J. The antiapoptotic effect of mesenchymal stem cell transplantation on ischemic myocardium is enhanced by anoxic preconditioning. *Can J Cardiol*. 2009 Jun;25(6):353–8.
222. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004 Mar 30;109(12):1543–9.
223. Zhang Y, Xia X, Yan J, Yan L, Lu C, Zhu X, et al. Mesenchymal stem cell-derived angiogenin promotes primordial follicle survival and angiogenesis in transplanted human ovarian tissue. *Reprod Biol Endocrinol*. 2017 Mar 9;15(1):18.
224. Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, et al. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res*. 2005 Jun 1;66(3):543–51.
225. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004 Mar 16;109(10):1292–8.
226. Ishikane S, Hosoda H, Yamahara K, Akitake Y, Kyoungsook J, Mishima K, et al. Allogeneic transplantation of fetal membrane-derived mesenchymal stem cell sheets increases neovascularization and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. *Transplantation*. 2013 Oct 27;96(8):697–706.
227. Eseonu OI, De Bari C. Homing of mesenchymal stem cells: mechanistic or stochastic? Implications for targeted delivery in arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2015 Feb;54(2):210–8.
228. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(6):1445–51.
229. Kim W-S, Park B-S, Kim H-K, Park J-S, Kim K-J, Choi J-S, et al. Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress. *J Dermatol Sci*. 2008 Feb;49(2):133–42.
230. Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, Gupta N, Serikov V, Lee J-W, et al. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells*. 2010 Dec;28(12):2229–38.
231. Sung DK, Chang YS, Sung SI, Yoo HS, Ahn SY, Park WS. Antibacterial effect of mesenchymal stem cells against *Escherichia coli* is mediated by secretion of beta-defensin-2 via toll-like receptor 4 signalling. *Cell Microbiol*. 2016 Mar;18(3):424–36.
232. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003 Feb 15;75(3):389–97.

233. Gazdic M, Volarevic V, Arsenijevic N, Stojkovic M. Mesenchymal Stem Cells: A Friend or Foe in Immune-Mediated Diseases. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2015 Apr;11(2):280–7.
234. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008 Feb 7;2(2):141–50.
235. Li W, Ren G, Huang Y, Su J, Han Y, Li J, et al. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death & Differentiation*. 2012 Sep;19(9):1505–13.
236. Dorronsoro A, Ferrin I, Salcedo JM, Jakobsson E, Fernández-Rueda J, Lang V, et al. Human mesenchymal stromal cells modulate T-cell responses through TNF- $\alpha$ -mediated activation of NF- $\kappa$ B. *Eur J Immunol*. 2014 Feb;44(2):480–8.
237. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Dimitrov R, Belemmezova K, Mourdjeva M, Kyurkchiev S, et al. Conditioned medium from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induces CD4+FOXP3+ cells and increases IL-10 secretion. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:295167.
238. Heo SC, Jeon ES, Lee IH, Kim HS, Kim MB, Kim JH. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing through paracrine mechanisms. *J Invest Dermatol*. 2011 Jul;131(7):1559–67.
239. Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L’Huillier A, Ling W, et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol*. 2010 Mar 1;184(5):2321–8.
240. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, et al. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant*. 2010;19(6):667–79.
241. Lin L, Du L. The role of secreted factors in stem cells-mediated immune regulation. *Cell Immunol*. 2018 Apr;326:24–32.
242. Wang D, Feng X, Lu L, Konkel JE, Zhang H, Chen Z, et al. A CD8 T cell/indoleamine 2,3-dioxygenase axis is required for mesenchymal stem cell suppression of human systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2014 Aug;66(8):2234–45.
243. Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Varela N, O’Valle F, Hernandez-Cortes P, Rico L, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010 Jan;69(1):241–8.
244. Luz-Crawford P, Kurte M, Bravo-Alegría J, Contreras R, Nova-Lamperti E, Tejedor G, et al. Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013 Jun 4;4(3):65.
245. Jones S, Horwood N, Cope A, Dazzi F. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol*. 2007 Sep 1;179(5):2824–31.
246. Brock TG, McNish RW, Peters-Golden M. Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2. *J Biol Chem*. 1999 Apr 23;274(17):11660–6.

247. Rozenberg A, Rezk A, Boivin M-N, Darlington PJ, Nyirenda M, Li R, et al. Human Mesenchymal Stem Cells Impact Th17 and Th1 Responses Through a Prostaglandin E2 and Myeloid-Dependent Mechanism. *Stem Cells Transl Med*. 2016 Nov;5(11):1506–14.
248. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noël D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS ONE*. 2010 Dec 7;5(12):e14247.
249. Tipnis S, Viswanathan C, Majumdar AS. Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. *Immunol Cell Biol*. 2010 Dec;88(8):795–806.
250. Mansilla E, Marin GH, Sturla F, Drago HE, Gil MA, Salas E, et al. Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. *Transplant Proc*. 2005 Feb;37(1):292–4.
251. Li J, Ezzelarab MB, Cooper DKC. Do mesenchymal stem cells function across species barriers? Relevance for xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2012 Oct;19(5):273–85.
252. Wang Q, Li X, Luo J, Zhang L, Ma L, Lv Z, et al. The allogeneic umbilical cord mesenchymal stem cells regulate the function of T helper 17 cells from patients with rheumatoid arthritis in an in vitro co-culture system. *BMC Musculoskelet Disord*. 2012 Dec;13(1):249.
253. Luz-Crawford P, Torres MJ, Noël D, Fernandez A, Toupet K, Alcayaga-Miranda F, et al. The immunosuppressive signature of menstrual blood mesenchymal stem cells entails opposite effects on experimental arthritis and graft versus host diseases: Immunosuppressive Signature of MenSC. *Stem Cells*. 2016 Feb;34(2):456–69.
254. Mohammadzadeh A, Pourfathollah AA, Shahrokhi S, Hashemi SM, Moradi SLA, Soleimani M. Immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on the gene expression of major transcription factors of T cell subsets. *Int Immunopharmacol*. 2014 Jun;20(2):316–21.
255. Luz-Crawford P, Noël D, Fernandez X, Khoury M, Figueroa F, Carrión F, et al. Mesenchymal stem cells repress Th17 molecular program through the PD-1 pathway. *PLoS ONE*. 2012;7(9):e45272.
256. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815–22.
257. Liu Y, Mu R, Wang S, Long L, Liu X, Li R, et al. Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(6):R210.
258. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):212–22.
259. Eggert M, Zettl UK, Neeck G. Autoantibodies in autoimmune diseases. *Curr Pharm Des*. 2010 May;16(14):1634–43.
260. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):367–72.
261. Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Sánchez-Abarca LI, Blanco B, López A, et al. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica*. 2008 Sep;93(9):1301–9.

262. Luk F, Carreras-Planella L, Korevaar SS, de Witte SFH, Borràs FE, Betjes MGH, et al. Inflammatory Conditions Dictate the Effect of Mesenchymal Stem or Stromal Cells on B Cell Function. *Front Immunol*. 2017;8:1042.
263. Luz-Crawford P, Djouad F, Toupet K, Bony C, Franquesa M, Hoogduijn MJ, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Interleukin 1 Receptor Antagonist Promotes Macrophage Polarization and Inhibits B Cell Differentiation: MSC-IL1RA Inhibits B Cell Differentiation. *STEM CELLS*. 2016 Feb;34(2):483–92.
264. Cho D-I, Kim MR, Jeong H, Jeong HC, Jeong MH, Yoon SH, et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Experimental & Molecular Medicine*. 2014 Jan;46(1):e70–e70.
265. Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy*. 2016 Mar 1;2(1):3–20.
266. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2—dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009 Jan;15(1):42–9.
267. Choi H, Lee RH, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- $\kappa$ B signaling in resident macrophages. *Blood*. 2011 Jul 14;118(2):330–8.
268. François M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther*. 2012 Jan;20(1):187–95.
269. Melief SM, Geutskens SB, Fibbe WE, Roelofs H. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. *Haematologica*. 2013 Jun;98(6):888–95.
270. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001 Aug 10;106(3):255–8.
271. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+ -derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2006 Aug 15;177(4):2080–7.
272. Jiang X-X, Zhang Y, Liu B, Zhang S-X, Wu Y, Yu X-D, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005 May 15;105(10):4120–6.
273. Zhang B, Liu R, Shi D, Liu X, Chen Y, Dou X, et al. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population. *Blood*. 2009 Jan 1;113(1):46–57.
274. Yuan X, Qin X, Wang D, Zhang Z, Tang X, Gao X, et al. Mesenchymal stem cell therapy induces FLT3L and CD1c + dendritic cells in systemic lupus erythematosus patients. *Nat Commun*. 2019 Jun 7;10(1):1–12.

275. Djouad F, Charbonnier L-M, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*. 2007 Aug;25(8):2025–32.
276. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. 2009 Jun 25;113(26):6576–83.
277. Liu Y, Yin Z, Zhang R, Yan K, Chen L, Chen F, et al. MSCs inhibit bone marrow-derived DC maturation and function through the release of TSG-6. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Aug 8;450(4):1409–15.
278. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):151–62.
279. Brandau S, Jakob M, Bruderek K, Bootz F, Giebel B, Radtke S, et al. Mesenchymal Stem Cells Augment the Anti-Bacterial Activity of Neutrophil Granulocytes. Jacobs R, editor. *PLoS ONE*. 2014 Sep 19;9(9):e106903.
280. Cassatella MA, Mosna F, Micheletti A, Lisi V, Tamassia N, Cont C, et al. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. *Stem Cells*. 2011 Jun;29(6):1001–11.
281. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1327–33.
282. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells. *STEM CELLS*. 2006;24(1):74–85.
283. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*. 2006 Feb 15;107(4):1484–90.
284. Najar M, Fayyad-Kazan M, Meuleman N, Bron D, Fayyad-Kazan H, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells of the bone marrow and natural killer cells: cell interactions and cross modulation. *J Cell Commun Signal*. 2018 Dec;12(4):673–88.
285. Mauer J, Chaurasia B, Goldau J, Vogt MC, Ruud J, Nguyen KD, et al. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat Immunol*. 2014 May;15(5):423–30.
286. Budoni M, Fierabracci A, Luciano R, Petrini S, Di Ciommo V, Muraca M. The immunosuppressive effect of mesenchymal stromal cells on B lymphocytes is mediated by membrane vesicles. *Cell Transplant*. 2013;22(2):369–79.
287. Zhang B, Yin Y, Lai RC, Tan SS, Choo ABH, Lim SK. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes. *Stem Cells Dev*. 2014 Jun 1;23(11):1233–44.

288. Zhao J, Li X, Hu J, Chen F, Qiao S, Sun X, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization. *Cardiovasc Res*. 2019 Jun 1;115(7):1205–16.
289. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol*. 2014 Nov;15(11):1009–16.
290. Chan JL, Tang KC, Patel AP, Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM, et al. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood*. 2006 Jun 15;107(12):4817–24.
291. Carreau A, Hafny-Rahbi BE, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med*. 2011 Jun;15(6):1239–53.
292. Das R, Jahr H, van Osch GJVM, Farrell E. The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010 Apr;16(2):159–68.
293. Elabd C, Ichim TE, Miller K, Anneling A, Grinstein V, Vargas V, et al. Comparing atmospheric and hypoxic cultured mesenchymal stem cell transcriptome: implication for stem cell therapies targeting intervertebral discs. *Journal of Translational Medicine*. 2018 Aug 10;16(1):222.
294. Chang C-P, Chio C-C, Cheong C-U, Chao C-M, Cheng B-C, Lin M-T. Hypoxic preconditioning enhances the therapeutic potential of the secretome from cultured human mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury. *Clin Sci*. 2013 Feb;124(3):165–76.
295. Luo Z, Wu F, Xue E, Huang L, Yan P, Pan X, et al. Hypoxia preconditioning promotes bone marrow mesenchymal stem cells survival by inducing HIF-1 $\alpha$  in injured neuronal cells derived exosomes culture system. *Cell Death Dis*. 2019 Feb 12;10(2):1–13.
296. Sart S, Tsai A-C, Li Y, Ma T. Three-Dimensional Aggregates of Mesenchymal Stem Cells: Cellular Mechanisms, Biological Properties, and Applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014 Oct 1;20(5):365–80.
297. Bartosh TJ, Ylöstalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Aug 3;107(31):13724–9.
298. Bartosh TJ, Ylöstalo JH, Bazhanov N, Kuhlman J, Prockop DJ. Dynamic compaction of human mesenchymal stem/precursor cells into spheres self-activates caspase-dependent IL1 signaling to enhance secretion of modulators of inflammation and immunity (PGE2, TSG6, and STC1). *Stem Cells*. 2013 Nov;31(11):2443–56.
299. Tsai A-C, Liu Y, Yuan X, Ma T. Compaction, Fusion, and Functional Activation of Three-Dimensional Human Mesenchymal Stem Cell Aggregate. *Tissue Eng Part A*. 2015 May 1;21(9–10):1705–19.
300. Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB. Toll-Like Receptors on Human Mesenchymal Stem Cells Drive Their Migration and Immunomodulating Responses. *STEM CELLS*. 2008;26(1):99–107.

301. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS ONE*. 2010 Apr 26;5(4):e10088.
302. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Filì L, Manuelli C, Frosali F, et al. Toll-Like Receptors 3 and 4 Are Expressed by Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Can Inhibit Their T-Cell Modulatory Activity by Impairing Notch Signaling. *STEM CELLS*. 2008;26(1):279–89.
303. Keating A. Mesenchymal Stromal Cells: New Directions. *Cell Stem Cell*. 2012 Jun;10(6):709–16.
304. Kim N, Cho S-G. Overcoming immunoregulatory plasticity of mesenchymal stem cells for accelerated clinical applications. *Int J Hematol*. 2016 Feb;103(2):129–37.
305. Kim DS, Jang IK, Lee MW, Ko YJ, Lee D-H, Lee JW, et al. Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon- $\gamma$ . *EBioMedicine*. 2018 Feb;28:261–73.
306. Luz-Crawford P, Ipseiz N, Espinosa-Carrasco G, Caicedo A, Tejedor G, Toupet K, et al. PPAR $\beta/\delta$  directs the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2016 Dec;75(12):2166–74.
307. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*. 2011 Jul 8;9(1):11–5.
308. Cosenza S, Ruiz M, Toupet K, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis. *Sci Rep*. 2017 24;7(1):16214.
309. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends in Immunology*. 2012 Mar;33(3):136–43.
310. Kurte M, Luz-Crawford P, Vega-Letter AM, Contreras RA, Tejedor G, Elizondo-Vega R, et al. IL17/IL17RA as a Novel Signaling Axis Driving Mesenchymal Stem Cell Therapeutic Function in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Immunol*. 2018;9:802.
311. Li X, Wang Q, Ding L, Wang Y-X, Zhao Z-D, Mao N, et al. Intercellular adhesion molecule-1 enhances the therapeutic effects of MSCs in a dextran sulfate sodium-induced colitis models by promoting MSCs homing to murine colons and spleens. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Aug 23;10(1):267.
312. Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol*. 2008 Jun;38(6):1745–55.
313. Zhang W, Zhou L, Dang J, Zhang X, Wang J, Chen Y, et al. Human Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Streptozotocin-induced T1DM in mice via Suppression of T effector cells and Up-regulating Treg Subsets. *Sci Rep*. 2017 10;7(1):15249.
314. Gonzalez-Rey E, Anderson P, González MA, Rico L, Büscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut*. 2009 Jul;58(7):929–39.
315. Heidari M, Pouya S, Baghaei K, Aghdaei HA, Namaki S, Zali MR, et al. The immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cells-conditioned medium in chronic colitis. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(11):8754–66.



316. Kong Q, Sun B, Wang G, Zhai D, Mu L, Wang D, et al. BM stromal cells ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th cells through the secretion of IDO. *Eur J Immunol*. 2009 Mar;39(3):800–9.
317. Maria ATJ, Toupet K, Maumus M, Fonteneau G, Le Quellec A, Jorgensen C, et al. Human adipose mesenchymal stem cells as potent anti-fibrosis therapy for systemic sclerosis. *J Autoimmun*. 2016;70:31–9.
318. Youd M, Blickarz C, Woodworth L, Touzjian T, Edling A, Tedstone J, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells do not protect NZB × NZW F1 mice from developing lupus disease. *Clin Exp Immunol*. 2010 Jul;161(1):176–86.
319. Park M-J, Kwok S-K, Lee S-H, Kim E-K, Park S-H, Cho M-L. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce Expansion of Interleukin-10-Producing Regulatory B Cells and Ameliorate Autoimmunity in a Murine Model of Systemic Lupus Erythematosus. *Cell Transplant*. 2015 Nov 1;24(11):2367–77.
320. Schurgers E, Kelchtermans H, Mitera T, Geboes L, Matthys P. Discrepancy between the in vitro and in vivo effects of murine mesenchymal stem cells on T cell proliferation and collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(1):R31.
321. González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*. 2009 Apr;60(4):1006–19.
322. Holmdahl R, Jansson L, Larsson E, Rubin K, Klareskog L. Homologous type II collagen induces chronic and progressive arthritis in mice. *Arthritis Rheum*. 1986 Jan;29(1):106–13.
323. Pietrosimone KM, Jin M, Poston B, Liu P. Collagen-Induced Arthritis: A model for Murine Autoimmune Arthritis. *Bio Protoc*. 2015 Oct 20;5(20).
324. Zhou B, Yuan J, Zhou Y, Ghawji M, Deng Y-P, Lee AJ, et al. Administering human adipose-derived mesenchymal stem cells to prevent and treat experimental arthritis. *Clinical Immunology*. 2011 Dec;141(3):328–37.
325. Choi J-J, Yoo S-A, Park S-J, Kang Y-J, Kim W-U, Oh I-H, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 attenuate collagen-induced arthritis in mice. *Clinical & Experimental Immunology*. 2008;153(2):269–76.
326. Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, Liew FY. Animal models of rheumatoid arthritis: FORUM. *Eur J Immunol*. 2009 Aug;39(8):2040–4.
327. Nam Y, Jung SM, Rim YA, Jung H, Lee K, Park N, et al. Intraperitoneal infusion of mesenchymal stem cell attenuates severity of collagen antibody induced arthritis. *PLoS One* [Internet]. 2018 Jun 7 [cited 2019 Oct 6];13(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5991665/>
328. Wong PKK, Quinn JMW, Sims NA, Nieuwenhuijze A van, Campbell IK, Wicks IP. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis & Rheumatism*. 2006;54(1):158–68.

329. Schinnerling K, Rosas C, Soto L, Thomas R, Aguilón JC. Humanized Mouse Models of Rheumatoid Arthritis for Studies on Immunopathogenesis and Preclinical Testing of Cell-Based Therapies. *Front Immunol*. 2019 Feb 19;10:203.
330. Kehoe O, Cartwright A, Askari A, El Haj AJ, Middleton J. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells leads to reduced inflammation and cartilage damage in murine antigen-induced arthritis. *J Transl Med*. 2014 Jun 3;12:157.
331. Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell*. 1996 Nov 29;87(5):811–22.
332. Bevaart L, Vervordeldonk MJ, Tak PP. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: How does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis & Rheumatism*. 2010 Apr 9;62(8):2192–205.
333. Papadopoulou A, Yiangou M, Athanasiou E, Zogas N, Kaloyannidis P, Batsis I, et al. Mesenchymal stem cells are conditionally therapeutic in preclinical models of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012 Oct;71(10):1733–40.
334. Chen B, Hu J, Liao L, Sun Z, Han Q, Song Z, et al. Flk-1+ mesenchymal stem cells aggravate collagen-induced arthritis by up-regulating interleukin-6. *Clin Exp Immunol*. 2010 Mar;159(3):292–302.
335. Hynes K, Bright R, Proudman S, Haynes D, Gronthos S, Bartold M. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cell in experimental arthritis in rat and mouse models: A systematic review. *Semin Arthritis Rheum*. 2016;46(1):1–19.
336. Kim N, Cho S-G. New Strategies for Overcoming Limitations of Mesenchymal Stem Cell-Based Immune Modulation. *IJSC*. 2015 May 30;8(1):54–68.
337. Duijvestein M, Wildenberg ME, Welling MM, Hennink S, Molendijk I, van Zuylen VL, et al. Pretreatment with interferon- $\gamma$  enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem Cells*. 2011 Oct;29(10):1549–58.
338. Kay AG, Long G, Tyler G, Stefan A, Broadfoot SJ, Piccinini AM, et al. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Reduces Disease Severity and Immune Responses in Inflammatory Arthritis. *Sci Rep*. 2017 21;7(1):18019.
339. Baek G, Choi H, Kim Y, Lee H-C, Choi C. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Therapeutics and as a Drug Delivery Platform. *Stem Cells Transl Med*. 2019 Sep;8(9):880–6.
340. Cosenza S, Toupet K, Maumus M, Luz-Crawford P, Blanc-Brude O, Jorgensen C, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis. *Theranostics*. 2018 Feb 3;8(5):1399–410.
341. Park M-J, Park H-S, Cho M-L, Oh H-J, Cho Y-G, Min S-Y, et al. Transforming growth factor  $\beta$ -transduced mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune arthritis through reciprocal regulation of Treg/Th17 cells and osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum*. 2011 Jun;63(6):1668–80.
342. Payne NL, Dantanarayana A, Sun G, Moussa L, Caine S, McDonald C, et al. Early intervention with gene-modified mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-4 enhances anti-inflammatory

responses and functional recovery in experimental autoimmune demyelination. *Cell Adh Migr.* 2012 Jun;6(3):179–89.

343. Marin-Bañasco C, Benabdellah K, Melero-Jerez C, Oliver B, Pinto-Medel MJ, Hurtado-Guerrero I, et al. Gene therapy with mesenchymal stem cells expressing IFN- $\beta$  ameliorates neuroinflammation in experimental models of multiple sclerosis. *Br J Pharmacol.* 2017;174(3):238–53.

344. Park N, Rim YA, Jung H, Kim J, Yi H, Kim Y, et al. Etanercept-Synthesising Mesenchymal Stem Cells Efficiently Ameliorate Collagen-Induced Arthritis. *Sci Rep.* 2017 13;7:39593.

345. Seo Y, Shin T-H, Kim H-S. Current Strategies to Enhance Adipose Stem Cell Function: An Update. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug 5;20(15).

346. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004 May 1;363(9419):1439–41.

347. Munir H, McGettrick HM. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Autoimmune Disease: Risks and Rewards. *Stem Cells Dev.* 2015 Sep 15;24(18):2091–100.

348. Pers Y-M, Rackwitz L, Ferreira R, Pullig O, Delfour C, Barry F, et al. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Transl Med.* 2016 Jul;5(7):847–56.

349. Ansboro S, Roelofs AJ, De Bari C. Mesenchymal stem cells for the management of rheumatoid arthritis: immune modulation, repair or both? *Curr Opin Rheumatol.* 2017;29(2):201–7.

350. Panés J, García-Olmo D, Van Assche G, Colombel JF, Reinisch W, Baumgart DC, et al. Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet.* 2016 Sep 24;388(10051):1281–90.

351. Duijvestein M, Vos ACW, Roelofs H, Wildenberg ME, Wendrich BB, Verspaget HW, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut.* 2010 Dec;59(12):1662–9.

352. Llufríu S, Sepúlveda M, Blanco Y, Marín P, Moreno B, Berenguer J, et al. Randomized placebo-controlled phase II trial of autologous mesenchymal stem cells in multiple sclerosis. *PLoS ONE.* 2014;9(12):e113936.

353. Wang D, Zhang H, Liang J, Wang H, Hua B, Feng X, et al. A Long-Term Follow-Up Study of Allogeneic Mesenchymal Stem/Stromal Cell Transplantation in Patients with Drug-Resistant Systemic Lupus Erythematosus. *Stem Cell Reports.* 2018 13;10(3):933–41.

354. Liang J, Li X, Zhang H, Wang D, Feng X, Wang H, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in patients with refractory RA. *Clin Rheumatol.* 2012 Jan;31(1):157–61.

355. Wang L, Wang L, Cong X, Liu G, Zhou J, Bai B, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for patients with active rheumatoid arthritis: safety and efficacy. *Stem Cells Dev.* 2013 Dec 15;22(24):3192–202.

356. Álvaro-Gracia JM, Jover JA, García-Vicuña R, Carreño L, Alonso A, Marsal S, et al. Intravenous administration of expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in refractory rheumatoid arthritis (Cx611): results of a multicentre, dose escalation, randomised, single-blind, placebo-controlled phase Ib/IIa clinical trial. *Ann Rheum Dis*. 2017 Jan;76(1):196–202.
357. Shadmanfar S, Labibzadeh N, Emadedin M, Jaroughi N, Azimian V, Mardpour S, et al. Intra-articular knee implantation of autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in rheumatoid arthritis patients with knee involvement: Results of a randomized, triple-blind, placebo-controlled phase 1/2 clinical trial. *Cytotherapy*. 2018 Apr;20(4):499–506.
358. Park EH, Lim H-S, Lee S, Roh K, Seo K-W, Kang K-S, et al. Intravenous Infusion of Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Rheumatoid Arthritis: A Phase Ia Clinical Trial. *Stem Cells Transl Med*. 2018 Sep;7(9):636–42.
359. Ghoryani M, Shariati-Sarabi Z, Tavakkol-Afshari J, Ghasemi A, Poursamimi J, Mohammadi M. Amelioration of clinical symptoms of patients with refractory rheumatoid arthritis following treatment with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells: A successful clinical trial in Iran. *Biomed Pharmacother*. 2019 Jan;109:1834–40.
360. Shi Y, Wang Y, Li Q, Liu K, Hou J, Shao C, et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(8):493–507.
361. Chen L, Wang S, Wang Y, Zhang W, Ma K, Hu C, et al. IL-6 influences the polarization of macrophages and the formation and growth of colorectal tumor. *Oncotarget*. 2018 Apr 3;9(25):17443–54.
362. Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, Ruiz-Rosado J de D, Popovich PG, Partida-Sanchez S, et al. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS ONE*. 2015;10(12):e0145342.
363. Hannemann N, Cao S, Eriksson D, Schnelzer A, Jordan J, Eberhardt M, et al. Transcription factor Fra-1 targets arginase-1 to enhance macrophage-mediated inflammation in arthritis. *J Clin Invest*. 2019 16;129(7):2669–84.
364. Brines R, Maicas N, Ferrándiz ML, Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J, et al. Heme oxygenase-1 regulates the progression of K/BxN serum transfer arthritis. *PLoS ONE*. 2012;7(12):e52435.
365. Li W, Ren G, Huang Y, Su J, Han Y, Li J, et al. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ*. 2012 Sep;19(9):1505–13.
366. Barrachina L, Remacha AR, Romero A, Vázquez FJ, Albareda J, Prades M, et al. Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2016 Mar;171:57–65.
367. Leijts MJC, van Buul GM, Lubberts E, Bos PK, Verhaar JAN, Hoogduijn MJ, et al. Effect of Arthritic Synovial Fluids on the Expression of Immunomodulatory Factors by Mesenchymal Stem Cells: An Explorative in vitro Study. *Front Immunol*. 2012;3:231.
368. Gómez-Puerta JA, Celis R, Hernández MV, Ruiz-Esquide V, Ramírez J, Haro I, et al. Differences in synovial fluid cytokine levels but not in synovial tissue cell infiltrate between anti-citrullinated

peptide/protein antibody-positive and -negative rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*. 2013 Nov 7;15(6):R182.

369. Redondo-Castro E, Cunningham C, Miller J, Martuscelli L, Aoulad-Ali S, Rothwell NJ, et al. Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic phenotype in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2017 17;8(1):79.

370. Bai M, Zhang L, Fu B, Bai J, Zhang Y, Cai G, et al. IL-17A improves the efficacy of mesenchymal stem cells in ischemic-reperfusion renal injury by increasing Treg percentages by the COX-2/PGE2 pathway. *Kidney Int*. 2018;93(4):814–25.

371. Xie Z, Tang S, Ye G, Wang P, Li J, Liu W, et al. Interleukin-6/interleukin-6 receptor complex promotes osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2018 22;9(1):13.

372. Du D, Zhou Z, Zhu L, Hu X, Lu J, Shi C, et al. TNF- $\alpha$  suppresses osteogenic differentiation of MSCs by accelerating P2Y2 receptor in estrogen-deficiency induced osteoporosis. *Bone*. 2018;117:161–70.

373. Lin T, Pajarinen J, Nabeshima A, Lu L, Nathan K, Jämsen E, et al. Preconditioning of murine mesenchymal stem cells synergistically enhanced immunomodulation and osteogenesis. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Dec 6;8(1):277.

374. Campia I, Buondonno I, Castella B, Rolando B, Kopecka J, Gazzano E, et al. An Autocrine Cytokine/JAK/STAT-Signaling Induces Kynurenine Synthesis in Multidrug Resistant Human Cancer Cells. Platten M, editor. *PLOS ONE*. 2015 May 8;10(5):e0126159.

375. Wang G, Cao K, Liu K, Xue Y, Roberts AI, Li F, et al. Kynurenic acid, an IDO metabolite, controls TSG-6-mediated immunosuppression of human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*. 2018 Jul;25(7):1209–23.

376. Mallinson DJ, Dunbar DR, Ridha S, Sutton ER, De la Rosa O, Dalemans W, et al. Identification of Potential Plasma microRNA Stratification Biomarkers for Response to Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Rheumatoid Arthritis: Plasma MiRNA ASC Stratification Biomarkers for RA. *STEM CELLS Translational Medicine*. 2017 Apr;6(4):1202–6.

377. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007 Apr;56(4):1175–86.

378. Yan M, Liu X, Dang Q, Huang H, Yang F, Li Y. Intra-Articular Injection of Human Synovial Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cells in Murine Collagen-Induced Arthritis: Assessment of Immunomodulatory Capacity In Vivo. *Stem Cells Int*. 2017;2017:9198328.

379. Franceschetti T, De Bari C. The potential role of adult stem cells in the management of the rheumatic diseases. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2017 Jul;9(7):165–79.

380. Wang D, Wang S, Huang S, Zhang Z, Yuan X, Feng X, et al. Serum IFN- $\gamma$  Predicts the Therapeutic Effect of Mesenchymal Stem Cells Transplantation in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(9):1777–85.